

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Biochem. Antje Brauckhoff

aus Stendal

Tag der mündlichen Prüfung:

**Funktionelle Relevanz der Ubiquitin-Ligasen *seven in absentia*
homologue (SIAH)-1 und SIAH-2 in der humanen Hepatokarzinogenese**

Gutachter:

Prof. Dr. B. Bukau

Prof. Dr. P. Schirmacher

Vorab veröffentlichte und öffentlich präsentierte Teilergebnisse dieser Arbeit:

Originalarbeit

Brauckhoff A., Ehemann V., Schirmacher P. und Breuhahn K. (2007):

»Reduzierte Expression der E3-Ubiquitin-Ligase *seven in absentia homologue* (SIAH)-1 in Zellen des humanen hepatozellulären Karzinoms« Verh Dtsch Ges Pathol. 91:269-77

Präsentationen

Brauckhoff A., Ehemann V., Franz M., Lamkemeyer T., Schirmacher P. und Breuhahn K. (2008):

»Distinkte protumorigene Effekte der *seven in absentia homologue* (SIAH) Ubiquitin-Ligase Familienmitglieder in der humanen Hepatokarzinogenese«; 24. Jahrestagung der deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Frankfurt am Main; *Posterpräsentation*

Brauckhoff A., Malz M., Schirmacher P. und Breuhahn K. (2007):

»Downregulation and nuclear accumulation of the Ubiquitin-Ligase *seven in absentia homologue-1* (SIAH-1) is involved in human carcinogenesis«; 91. Jahrestagung der Gesellschaft für Pathologie, Magdeburg; *Vortrag*

Brauckhoff A., Malz M., Schirmacher P. und Breuhahn K. (2007):

»Downregulation and nuclear accumulation of the ubiquitin-ligase *seven in absentia homologue-1* (SIAH-1) is involved in human carcinogenesis«; 14th International AEK Cancer Congress, Frankfurt am Main; *Posterpräsentation*

Brauckhoff A., Malz M., Schirmacher P. und Breuhahn K. (2007):

»Nuclear accumulation of the E3-ubiquitin ligase SIAH-1 promotes tumor cell growth«; FALK Research Workshop "Morphogenesis and Cancerogenesis of the Liver", Göttingen, *Posterpräsentation*

Brauckhoff A., Ehemann V., Schirmacher P. und Breuhahn K. (2007):

»Differentielle Funktionen der Ubiquitin-Ligasen *seven in absentia homologue* (SIAH)-1 und SIAH-2 in der humanen Hepatokarzinogenese«; 23. Jahrestagung der deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Göttingen, *Posterpräsentation*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1. Einleitung.....	5
1.1 Aufbau und Funktion der Leber.....	5
1.2 Das hepatozelluläre Karzinom.....	6
1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie des hepatozellulären Karzinoms.....	6
1.2.2 Molekulare Progressions-Mechanismen der Hepatokarzinogenese.....	8
1.3 Proteinmodifikation und Proteindegradation.....	11
1.3.1 Ubiquitin-Proteasom-System.....	11
1.3.2 Funktionen des Ubiquitin-Proteasom-Systems.....	13
1.3.3 Dysregulation der Proteolyse in der humanen (Hepato)karzinogenese.....	14
1.4 <i>Seven in absentia</i> homologue (SIAH).....	17
1.5 Zielsetzung.....	18
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Lösungen, Chemikalien und Kits.....	20
2.2 Geräte.....	21
2.3 Software.....	22
2.4 Antikörper.....	23
2.5 Oligonukleotid- und siRNA Sequenzen.....	24
2.6 Zellkulturmedien, Lösungen und Zellkulturzusätze.....	25
2.7 Zelllinien.....	26
2.8 Zellkultur.....	27
2.8.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien.....	27
2.8.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien.....	28
2.8.3 Kontaminationsbestimmung.....	28
2.8.4 Transiente <i>small-interfering</i> RNA (siRNA)-Transfektion.....	28
2.8.5 Behandlung mit Chemotherapeutika und PGE2.....	29
2.8.6 Behandlung mit Inhibitoren.....	30
2.9 Nukleinsäure-Techniken.....	30
2.9.1 siRNA Annealing.....	30

2.9.2 DNA/RNA/Protein – Isolierung aus Gewebe.....	31
2.9.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien.....	31
2.9.4 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	31
2.9.5 cDNA-Synthese – Reverse Transkription.....	32
2.9.6 Semiquantitative „ <i>realtime</i> “ PCR.....	32
2.9.7 PCR – Polymerasekettenreaktion.....	35
2.10 Proteinanalytik.....	36
2.10.1 Isolierung von Gesamtprotein.....	36
2.10.2 Isolierung subzellulärer Proteinfractionen.....	36
2.10.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37
2.10.4 Western Blot.....	38
2.10.5 Densitometrische Auswertung zur semiquantitativen Analyse der Expression.....	39
2.10.6 Tissue-Micro-Array Analysen und Immunhistochemie.....	40
2.10.7 Immunfluoreszenz.....	41
2.11 Funktionelle Analysen.....	42
2.11.1 Bestimmung der Zellvitalität – „MTT-Assay“	42
2.11.2 Bestimmung der Proliferation – „BrdU-ELISA“	43
2.11.3 Bestimmung der Apoptoserate – „FACS-Analyse“	43
2.11.4 Bestimmung der Migration - „Scratch-Assay“	44
2.11.5 Bestimmung der Klonogenität.....	45
2.12 Statistische Analysen.....	45
3. Ergebnisse.....	46
3.1 Expression von SIAH-1 und SIAH-2 in der Hepatokarzinogenese.....	46
3.2 Subzelluläre Lokalisation und Expression von SIAH-1 und SIAH-2 in HCC-Zelllinien.....	50
3.2.1 Untersuchung der Expression und Lokalisation von SIAH-1 und SIAH-2 in HCC- Zelllinien.....	50
3.3 Optimierung des siRNA Transfektionsprozesses.....	54
3.4 Reduktion der SIAH-1 und SIAH-2 Expression durch genspezifische siRNA Transfektion in HCC-Zellen.....	57
3.4.1 Reduktion der Zellvitalität nach SIAH-1 und SIAH-2 Inhibierung in HCC-Zellen.....	59

3.4.2 SIAH-1 und SIAH-2 sind Regulatoren der Proliferation und Tumorzellapoptose.....	60
3.4.3 Bestimmung der Klonogenität nach Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2.....	62
3.4.4 Einfluss der Reduktion von SIAH-1 und SIAH-2 auf die Migration von HCC-Zellen.....	63
3.5 SIAH-Inhibierung sensibilisiert HCC-Zellen gegenüber die Behandlung mit Chemotherapeutika.....	64
3.6 p53-abhängige Regulation von SIAH Ligasen in HCC-Zellen.....	67
3.7 Identifizierung von SIAH Zielstrukturen in HCC Zellen.....	70
3.7.1 Der Transkriptionsfaktor FBP-3 in der Hepatokarzinogenese.....	73
4. Diskussion.....	76
4.1 Regulation, Expression und Lokalisation der Ubiquitin-Ligasen SIAH-1 und SIAH-2 im HCC.....	77
4.2 Protumorigene Funktionen von SIAH-1 und SIAH-2 in der Hepatokarzinogenese... ..	80
4.3 Vermittlung der protumorigenen Eigenschaften der Ubiquitin-Ligasen SIAH-1 und SIAH-2.....	84
4.4 Die Ubiquitin-Ligasen SIAH-1 und SIAH-2 als therapeutische Zielstrukturen.....	88
5. Literaturverzeichnis.....	90
6. Danksagung.....	105

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Amper
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
as	antisense
BAG-1	BCL2-associated athanogene
BAX	BCL2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaar(e)
BRCA1	breast cancer 1
BrdU	Brom-desoxy-Uracil
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNA	complementary DNA
CGH	Comparative Genomic Hybridization
COX-2	Cyclooxygenase-2
CtIP	CtBP-interacting protein
DCC	deleted in colorectal cancer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dysplastischer Knoten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dsRNA	doppelsträngige RNA

EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FA	Fanconi Anämie
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAM	5,6-Carboxyfluoreszin
FAS	Fatty acid synthase
FBP	far upstream element sequence (FUSE)-binding protein
FCS	Fötales Kälberserum
FIR	FBP-interacting-repressor
FRA6E	fragile site, aphidicolin type, common, fra(6)(q26)
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
HBV	Hepatitis B Virus
HBx	Hepatitis B Virus X-Protein
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IGFII	insulin-like growth factor 2
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
LOH	loss-of-heterozygosity
M	Molar
mm	Mili
MAP	Mitogen-activated protein
MDM2	transformed 3T3 cell double minute 2
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazoliumbromid

MW	Mittelwert
myb	Onkogen myb
myc	Onkogen myc
n	Nano
N-CoR	nuclear receptor corepressor
nt	Nukleotid(e)
p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p53	Transforming-related Protein 53
PAA	Polyacrylamid
PARK2	Parkinson disease protein 2
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAD6	ubiquitin-conjugating enzyme E2A
Raf	rapidly growing fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RB-1	Retinoblastoma Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	round per minute
RT	Raumtemperatur
SCF	Skp, Cullin, F-box containing complex
SDS	Natriumdodecylsulfat; (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SIAH	seven in absentia, drosophila homolog
SINA	seven in absentia
SIP	Siah interacting protein
siRNA	small inhibitory RNA
SKP1	S-phase kinase-associated protein
Std.	Stunde

STABW	Standardabweichung
TAMRA	Tetramethyl-6-carboxyrhodamin
TMA	Tissue-Micro-Array
U	Unit
u.a.	unter anderem
Ubl	ubiquitin-like protein
UBP	Ubiquitin-spezifische Protease
UCH	Ubiquitin C-terminalen Hydrolase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
V	Volt
WB	Western Blot
WNT	wingless-type MMTV integration site family
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro (10 ⁻⁶)

Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre maligne Tumor der Leber; es geht mit einer sehr schlechten Prognose einher. Neben der Dysregulation von Syntheseprozessen stellt auch der alterierte proteasomale Abbau von Proteinen durch Ubiquitin-Ligasen einen potentiellen protumorigenen Mechanismus dar. Der wichtigste Prozess zur Degradation von Zielstrukturen in eukaryontischen Zellen ist die Ubiquitin-26S-Proteasom-vermittelte Degradation durch die mehr als 80% aller zellulären Proteine spezifisch und energie-abhängig abgebaut werden. Für die E3-Ubiquitin-Ligasen *seven in absentia homologue* (SIAH)-1 und SIAH-2 wird der durch Polyubiquitylierung vermittelte Abbau verschiedener funktioneller und struktureller Klassen von Proteinen, wie β -Catenin und Synaptophysin, bewirkt. In unabhängigen Studien konnte eine Reduktion SIAH-1 Expression in HCCs nachgewiesen werden, was einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit dieser Bindepartner im Rahmen der Lebertumorentstehung oder Progression vermuten lässt. Ziel dieser Studie war daher die vergleichende Analyse von SIAH-1 und SIAH-2 hinsichtlich Expression und Funktion in der humanen Hepatokarzinogenese.

In einem HCC Kollektiv wurde für SIAH-1 eine Reduktion der Expression bestätigt, wohingegen keine signifikante Expressionsänderung für SIAH-2 detektiert wurde. Während in Hepatozyten eine zytoplasmatische Expression für beide E3-Ligasen nachgewiesen wurde, war eine signifikante und progressive nukleäre Akkumulation in Vorläuferläsionen und HCC Zellen zu beobachten. In HCC-Zelllinien führte die Inhibierung beider Ubiquitin-Ligasen zu einer Reduktion der Tumorzellproliferation und Migration, als auch zu einer Induktion von Apoptose. Die gleichzeitige Inhibierung beider Ligasen verstärkte die beobachteten biologischen Effekte nur geringfügig, was für nicht redundante Effekte beider Ligasen spricht. Eine Inhibierung der Ubiquitin-Ligasen führte darüber hinaus zu einer signifikanten Sensibilisierung der HCC Zellen gegenüber der Behandlung mit solchen Chemotherapeutika, welche sowohl die Stabilität des Mikrotubulusnetzwerkes verändern als auch in DNA interkalieren. Im Gegensatz zu bereits beschriebenen *in vitro*-Modellen konnte in den HCC Zelllinien keine Regulation von SIAH-1 durch das Tumorsuppressorgen p53 nachgewiesen werden. Überraschenderweise induzierte die Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 in HCC Zellen nicht die Bioverfügbarkeit von bekannten Bindungspartnern (z.B. T-Star und β -Catenin), sondern führte zu einer verringerten Expression von *far upstream sequence*

element (FUSE) binding protein (FBP)-Familienmitgliedern, welche zentrale Mediatoren der Tumorzellproliferation und Migration darstellen.

Zusammenfassend demonstrieren diese Daten, dass das protumorigene Potential von SIAH-1 und SIAH-2 nicht durch eine veränderte (reduzierte) Expression, sondern durch nukleäre Akkumulation und durch die Aktivierung distinkter molekulare Mechanismen vermittelt wird. Aufgrund der Tumorzell-assoziierten nukleären Expression unterscheidet sich die Funktion von SIAH-1 und SIAH-2 als auch die molekularen Effektormechanismen in HCC Zellen deutlich von anderen Zelltypen. Darüber hinaus stellt die Inhibierung der subzellulären Translokation bzw. die Reduktion der nukleären Bioaktivität der SIAH-Ligasen eine neue Möglichkeit zur Sensibilisierung von Tumorzellen mit zytotoxischen Substanzen dar.

Summary

The hepatocellular carcinoma (HCC) is the most frequent malignant tumor of the liver, which comes along with a bad prognosis for the patient. Next to the dysregulation of different metabolic processes, the aberrant proteasomal degradation of target proteins by E3-ubiquitin-ligases represents a potential pro-tumorigenic mechanism in the process of tumor initiation and progression. The most important process for protein degradation in eucaryotic cells is the ubiquitin-26S-proteasom-dependent degradation, by which more than 80% of all cellular proteins were degraded. The E3-ubiquitin-ligases *seven in absentia homologue* (SIAH)-1 and SIAH-2 catalyze the polyubiquitylation and subsequent degradation of different functional and structural classes of proteins like β -Catenin and Synaptophysin. Independent studies demonstrated that SIAH-1 expression is reduced in HCCs which suggests a potential pro-tumorigenic function in hepatocarcinogenesis. The purpose of this study was the comprehensive comparative analysis of SIAH-1 and SIAH-2 concerning expression, function and therapeutic relevance in human hepatocarcinogenesis.

While reduced SIAH-1 levels were confirmed for SIAH-1 in HCCs, no significant changes in the expression of SIAH-2 were detected. While in normal hepatocyt a cytoplasmatic expression was detected for both E3-ligases, a significant and progressive nuclear accumulation was observed in pre-malignant lesions and HCC tissues. In HCC cell lines the inhibition of both ubiquitin-ligases by RNA*interference* was associated with a reduction of the tumor cell proliferation and migration, as well as an induction of apoptosis. The combined inhibition of both ligases augmented the biological effects only moderately, strongly suggesting exclusive molecular mechanisms for both ligases. In addition, an SIAH inhibition led to a significant sensitization of HCC cells for treatment with cytotoxic substances which affect the stability of the microtubule-network as well as the DNA integrity. Although SIAH-1 was described as a p53 target gene no regulation of SIAH-1 was detected in the HCC cell lines after regulation of wildtype p53. The inhibition of SIAH-1 and SIAH-2 did not change the bioavailability of previously described target proteins (e.g. T-Star and β -Catenin), but led to a reduced expression of *far upstream sequence element* (FUSE) *binding protein* (FBP) family members, which are central mediators of the tumor cell proliferation and migration.

In summary, these data demonstrate that the pro-tumorigenic function of SIAH-1 and

SIAH-2 are not mediated by a changed (reduced) expression level, but by nuclear accumulation and the activation of distinct molecular mechanisms. Due to the tumor cell-associated nuclear expression, the function of SIAH-1 and SIAH-2 as well as the molecular effector mechanisms significantly differ in HCC cells from other (non-tumorigenic) cell types. Furthermore, the inhibition of the subcellular translocation, and the reduction of the nuclear bioactivity of the SIAH-ligases exhibit a new therapeutic option for the sensitization of tumor cells for the treatment with cytotoxic substances.

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Leber

Die menschliche Leber stellt mit durchschnittlich 1,5 kg Gewicht das zweitschwerste Organ im Körper, und als größte Drüse ein zentrales Organ des gesamten Stoffwechsels dar. Sie besteht aus 2 Leberlappen, wobei der rechte Leberlappen ca. um das 6-fache größer ist als der linke. Die morphologische Untereinheit der Leber sind die Leberläppchen (Lobuli hepatici), welche überwiegend aus Leberparenchymzellen (Hepatozyten) und dazwischenliegenden Sinusoiden (erweiterte Leberkapillaren) bestehen. Die Leberläppchen weisen eine sechseckige Struktur auf, an deren Ecken sich die sogenannten Periportalfelder befinden. Diese bezeichnet man als *Glisson-Trias* (Glissonsches Dreieck, periportale Trias) und enthalten jeweils einen feinen Ast der Pfortader, einen Ast der Leberarterie und einen kleinen Gallengang. Jedes Portalfeld versorgt auf diese Art drei Leberläppchen mit arteriellem Blut, Pfortaderblut und führt Gallensäure ab. In der Mitte eines sechseckigen Leberläppchens befindet sich die Zentralvene. Die Sinusoide werden von Kupffer-Sternzellen, leberspezifische Macrophagen die dem Pfortader-Blut körperfremde und körpereigene Substanzen entnehmen und abbauen, und Endothelzellen ausgekleidet. Im Spaltraum zwischen Hepatozyten und den Sinusoiden sind ebenfalls die hepatischen Sternzellen lokalisiert, welche maßgeblich für die Vitamin A Speicherung und die Synthese extrazellulärer Matrix verantwortlich sind.¹

Die Struktur der Leber ist bedingt durch ihre 3 Hauptfunktionen: a) Aufnahme, Speicherung und Metabolisierung von Stoffen, b) Bildung der Galle als Sekret und Exkret und c) Filter- und Kontrollorgan. Die Leber spielt eine zentrale Rolle im Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel, aber auch bei der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten. Sie ist für die Synthese lebenswichtiger Eiweißstoffe (z.B. Blutgerinnungsfaktoren), Cholesterol, die daraus abgeleiteten Gallensäuren und die Speicherung essentieller Moleküle und Elemente, wie Vitamine (A, B12, D, E), Folsäure, Metallionen (z.B. Eisen), aber auch Lipoproteine verantwortlich. Durch die Umwandlung von Glukose in Glycogen (Glycogenese), wird der Blutzuckerspiegel unabhängig von der Nahrungsmittelzufuhr reguliert, indem das Glycogen als Energiereserve dient und bei Bedarf in seine Glukosemonomere abgebaut werden kann (Glykogenolyse). Neben der Synthese und Speicherung, ist eine weitere Hauptfunktion der Leber, der Abbau von Stoffwechselprodukten. Beim Abbau von Eiweiß entsteht giftiges Ammoniak, welches

durch die Kupffer-Zellen neutralisiert und zu Harnstoff verstoffwechselt wird. Die Kupffer-Zellen entfernen ebenfalls geschädigte Erythrozyten durch Phagozytose. Die Leber ist des Weiteren für die Bildung der Gallenflüssigkeit verantwortlich. Die Galle ist eine gemischte Flüssigkeit, die aus Fett (Cholesterin), Gallensäuren, Gallenfarbstoffen, Gallensalzen und andere Stoffen besteht. Sie dient sowohl der Ausscheidung von nicht mehr benötigten, möglicherweise giftigen Substanzen, als auch der Unterstützung bei der Verdauung fettreicher Nahrung.

1.2 Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom („*hepatocellular carcinoma*“, HCC) ist ein primärer Lebertumor und zählt zu den häufigsten malignen humanen Tumoren weltweit. Das HCC gehört zu den Tumoren, bei denen die zugrunde liegende Ätiologie in mehr als 80% der Fälle definiert werden kann und basiert meist auf einer chronischen Leberentzündung (Hepatitis), mit sich anschließender Leberfibrose (Bindegewebsvermehrung) und Zirrhose (irreversibler Umbau mit Funktionsverlust). Da eine Chemotherapie meist nur geringe Wirkung auf das Progressionsgeschehen des HCC ausübt, bleiben häufig nur die Leberteileresektion und in wenigen Fällen auch die Lebertransplantation als operative Therapieoptionen. Diese sind, aufgrund des fortgeschrittenen Tumorstadiums bei Diagnose, jedoch nur in ca. 5% der Fälle möglich. Ein für die Behandlung des HCCs, aber auch anderer Tumorentitäten (z.B. fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom), eingesetzter Wirkstoff ist das Sorafenib. Es gehört zur Gruppe der Multikinase-Inhibitoren, der die Proliferation der Tumorzellen und die Neoangiogenese von Gefäßendothelien hemmt.² Das durchschnittliche Überleben der Patienten unter Sorafenib-Behandlung verlängert sich um 3-4 Monate. Bisher existieren keine weiteren suffizienten molekularen Therapien, daher stellt die Erforschung neuer, innovativer molekularer Zielstrukturen für die Entwicklung spezifischer therapeutischer Ansätze eine zentrale Herausforderung für die klinisch orientierte Forschung dar.

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie des hepatozellulären Karzinoms

Das HCC gilt mit etwa 1 Million Neuerkrankungen pro Jahr als fünf-häufigstes humanes Malignom mit steigender Inzidenz, vor allem in den westlichen Industrieregionen wie den USA und Europa.³ Es geht einher mit einer schlechten Prognose für den Patienten; die 5-Jahres Überlebensrate nach Diagnosestellung liegt bei 3%.⁴⁻⁶ Das HCC zeigt in fast allen

untersuchten Populationen eine deutliche Geschlechtsprädisposition: Männer erkranken in Mitteleuropa und Nordamerika 2 – 3 mal häufiger als Frauen.⁶ Daneben gibt es auch starke Unterschiede in der geographischen Verteilung des HCC. Die höchste Prävalenz ist mit ca. 80% in den südlichen Teilen Afrikas und in Südostasien zu finden. Hier liegt die Inzidenz bei 50-150 Neuerkrankungen/100000 Einwohner/Jahr, wohingegen in Nordamerika und Europa jährlich 1-3 Neuerkrankungen/100000 Einwohner/Jahr zu verzeichnen sind.⁷ Die Inzidenz in Deutschland wird mit derzeit 4000-6000 Neuerkrankungen/100000 Einwohner/Jahr angegeben, jedoch mit eindeutig steigender Tendenz. Diese regionalen und geographischen Unterschiede lassen sich durch die unterschiedliche Exposition mit bekannten Risikofaktoren erklären. Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines HCC sind zweifelsfrei die chronische Hepatitis B Virus (HBV)- und Hepatitis C Virus-Infektion (HCV). Diese erhöhen die Wahrscheinlichkeit an einem HCC zu erkranken um den Faktor 5-10 im Fall einer HBV-Infektion und ca. um den Faktor 17 im Fall einer HCV-Infektion.⁸ In den Industriestaaten gibt es trotz des geringeren Gesamtrisikos einen Anstieg der Neuerkrankungen, wobei die Infektion mit HCV die Hauptursache für die Entwicklung eines HCC darstellt.^{9, 10} In Europa und den USA sind 30-60% der HCC-Patienten HCV-positiv und in Japan sind sogar 80% der HCC-Erkrankungen mit einer chronischen HCV-Infektion assoziiert.¹¹⁻¹⁴ Weitere ätiologische Ursachen für die Entstehung eines HCC stellen hereditäre, metabolische Leberspeicherkrankheiten (hereditäre Hämochromatose, α -1-Antitrypsinmangel), Alkoholabusus mit assoziierter alkoholischer Steatohepatitis, die nicht-alkoholische Steatohepatitis, seltener auch die dauerhafte Kontamination mit Toxinen und Zellgiften (z.B. Aflatoxin B1) dar.¹⁵

Die Hepatokarzinogenese ist ein mehrjähriger, schrittweiser Prozess, der beginnend vom Auftreten erster Krankheitsbilder bis hin zur Manifestation eines HCCs häufig über Jahre oder Jahrzehnte andauern kann.¹⁶ Aus den unterschiedlichen Krankheitsursachen resultieren chronische Leberschädigungen wie Fibrose und später auch Zirrhose. Die Fibrose stellt eine krankhafte Vermehrung des Bindegewebes dar, dessen Hauptbestandteil extrazelluläre Kollagenfasern sind. Durch die Verhärtung der Leber entstehen narbige Veränderungen, die im fortgeschrittenen Stadium zu einer drastischen Einschränkung der Organfunktion führen können. Die Zirrhose repräsentiert das Endstadium diverser schwerer entzündlicher und nekrotisierender Leberschädigungen und ist in der Regel mit dem Funktionsverlust der Leber verbunden.¹ Auf der Grundlage

chronischer Lebererkrankungen kommt es häufig zur Ausbildung von reversiblen Vorläuferläsionen. Die frühesten prä malignen Vorläufer stellen die Dysplastischen Foci (Durchmesser $< 0,1$ cm) dar, aus denen sich durch weiteres Wachstum die Dysplastischen Knoten (DN; Durchmesser $0,1 - 2$ cm) entwickeln.¹⁷ Im weiteren Verlauf entstehen aus diesen prä malignen Vorläuferläsionen die frühen (gut differenzierten) HCCs, welche eine vergleichsweise geringe Proliferation und keine Angioinvasivität aufweisen und die späten (schlecht differenzierten) HCCs, deren Progression einhergehen mit einem gesteigertem Tumorwachstum, Tumorinvasion und Metastasierung (Abbildung 1).¹⁸

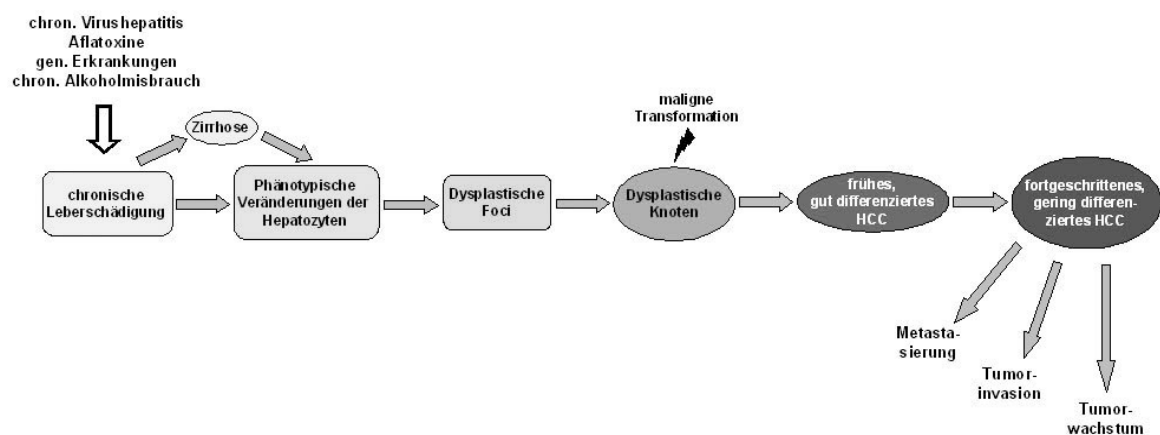


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hepatokarzinogenese

1.2.2 Molekulare Progressions-Mechanismen der Hepatokarzinogenese

In den frühen, aber auch in den späten Phasen der Hepatokarzinogenese kommt es zur Dysregulation von Proteinen, welche Zellproliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung, Motilität und zelluläre Reparaturmechanismen beeinflussen.¹⁹ Mögliche Ursachen für Veränderungen in der Genexpression zentraler Regulatorproteine dieser Prozesse können chromosomale Alterationen sein. *Comparative Genomic Hybridization* (CGH)-Analysen ergaben signifikante genomische Imbalancen in distinkten Chromosomenabschnitten. Hierbei wurden häufig Zugewinne, in den Regionen 1q (57,1%), 8q (46,6%), 6p (22,3%) und 17p (22,2%), als auch chromosomale Verluste in den Regionen 8p (38%), 16q (35,9%), 4q (34,3%), 17p (32,2%) und 13q (26,2%) detektiert.²⁰⁻²² Darüber hinaus wurden Verluste in den Regionen 4q, 17p und 16q mit der Entwicklung von HBV-induzierten HCCs assoziiert, was auf Ätiologie-spezifische Mechanismen hindeutet. Den meisten chromosomalen Alterationen konnten mittlerweile, die Dysregulation distinkter, relevanter Gene zugeordnet werden: *TP53* (17p), *RB-1* (13q), *E-Cadherin* (16q),

COX-2/cPLA2 (1q), und *c-myc* (8q).^{23, 24}

Ein zentraler Regulator der Apoptose, der DNA-Reparatur und der Zellzykluskontrolle ist das Tumorsuppressorgen *Tp53*.^{25, 26} In rund 50% aller humanen Tumore und 30% der HCCs liegt ein Funktionsverlust von p53 vor, was mit der Einbuße seiner antineoplastischen Eigenschaften einhergeht (Verlust der Zellzykluskontrolle, Antiapoptose und Regulation der DNA-Reparaturmechanismen).^{16, 27} Weitere Gründe für den beobachteten Funktionsverlust sind neben dem Verlust des Genlocus 17p, auch Punktmutationen, Deletionen oder die funktionelle Inaktivierung durch Bindung des p53^{wt} an virale Proteine wie das Hepatitis B HbxAg.^{28, 29} Für das HCC ist jedoch nicht nur der Funktionsverlust von p53 (sog. ‚*loss of function*‘) beschrieben worden, sondern auch der Zugewinn neuer, protumorigener Eigenschaften (‚*gain of function*‘).³⁰⁻³²

Das Tumorsuppressorgen *rb-1* ist ein Regulator des Zellzyklus und kontrolliert den Übergang der Zelle von der G1 in die S-Phase durch Bindung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Die Regulation der Aktivität des RB-1 Proteins erfolgt über die Phosphorylierung durch cyclinabhängige Kinasen (‚*cyclin dependent kinase*‘, CDKs) und führt zur Freisetzung der Transkriptionsfaktoren, gefolgt von DNA-Synthese und Zellzyklus-Progression. In ca. 30% aller HCCs ist ein Funktionsverlust des RB-1 beschrieben, der in den meisten Fällen auf einen Verlust des Genlocus 13q14 zurückzuführen ist.³³ Inaktivierende Mutationen sind bisher für RB-1 kaum beschrieben worden.³⁴ Ein Verlust der RB-1 Expression führt zu einer vermehrten Freisetzung von E2F und somit zur Steigerung der Proliferationsrate. Auch die Zunahme von CDKs (z.B. CDK4), welche für die Inhibierung von RB-1 verantwortlich sind oder die verringerte Bioverfügbarkeit von CDK-Inhibitoren (p16^{INK4A}, p21^{CIP1} oder p27^{KIP1}) kann zu einem Verlust der Zellzykluskontrolle führen.³⁵

Die erhöhte Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ebenfalls mit Tumorzellproliferation, sowie Antiapoptose assoziiert. Darüber hinaus vermittelt COX-2 Neoangiogenese und somit invasives Verhalten in Endothelzellen.^{36, 37} COX-2 ist ein Enzyme, welches die Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandin katalysiert. Die spezifische Inhibierung von COX-2 führt zur Aktivierung verschiedener Caspasen (z.B. Caspase 3 und Caspase 9) und zur Induktion der Apoptose.³⁸ Eine Überexpression von COX-2 konnte in 50-97% der HCCs nachgewiesen werden und ist unter anderem auf die Amplifikation der Chromosomenregion 1q25.2-q25.3, auf dem *cox-2* lokalisiert ist, zurück zu führen.^{39, 40}

Neben der Dysregulation der beschriebenen Genprodukte, kann es im Rahmen der Hepatokarzinogenese zur Modifikation ganzer Signalwege (z.B. IGF-Achse, Wingless (WNT)-Signalweg, TGF β -Signalweg oder HGF/MET-Signalweg) kommen. Diese Veränderungen basieren in der Regel auf der Dysregulation einzelner Signalwegskomponenten. In 25-30% der HCCs wurde z.B. eine veränderte Regulation des konservierten *wnt*-Signalweges beschrieben, welcher an der Regulation der Proliferation, der Motilität und der Organogenese beteiligt ist.⁴¹ Neben *survivin* (Antiapoptose), Matrix-Metalloproteinasen (*mmp-7*; Invasion), *myc* (Proliferation) und *vascular endothelial growth factor* (*vegf*; Neoangiogenese) gehört auch *Cyclin D1* zu den beschriebenen Zielgenen.⁴² Durch die Bindung der WNT-Liganden an einen der *Frizzled*-Rezeptoren, kommt es zur Phosphorylierung des Protein Dishevelled (DSH), welches seinerseits die Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3 β)-vermittelte Phosphorylierung und Ubiquitylierung des cytoplasmatischen Co-Aktivators β -Catenin inhibiert, welches anschließend durch das 26S Proteasom degradiert wird.⁴³ Durch Mutation, z.B. in der GSK3 β -Bindestelle des β -Catenin, ist eine effektive Phosphorylierung und der damit verbundene Abbau durch den SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex (Skp1/Cul1/F-box protein complex) nicht mehr gewährleistet. Dies hat zur Folge, dass die Degradation von β -Catenin nicht mehr in vollem Maße erfolgen kann und es zu einer Anreicherung im Kern in ca. 40% der HCCs kommt, wo es mit den Transkriptionsfaktoren der TCF (T cell factor)/LEF (lymphocyte enhancer binding factor)-Familie einen Komplex bildet und so die Expression von Zielgenen induziert.⁴⁴⁻⁴⁸ Daneben existieren zahlreiche beschriebene Mechanismen, die zu einer Anreicherung des β -Catenins in HCC-Zellen führen können, z.B. die Mutation des Axin1 und Axin2, Komponenten des Degradationskomplexes.⁴⁹

Der Insulin like Growth Factor (IGF) Signalweg ist sowohl in der embryonalen Entwicklung wie auch im Adulten von zentraler Bedeutung. Über ihn werden Antiapoptose, Proliferation und Zelldifferenzierung vermittelt. Es konnte eine pathophysiologische Verbindung zwischem dem Liganden IGF-II und der Tumorzellproliferation in der humanen Hepatokarzinogenese nachgewiesen werden.⁵⁰ Eine Überexpression von IGF-II ist ein frühes Ereignis in der Hepatokarzinogenese, denn sie kann bereits in dysplastischen Foci und in ca. 40% der HCCs beobachtet werden.⁵¹⁻⁵⁴ Eine Ursache ist eine verstärkte Aktivität des fötalen P3 Promotors im HCC,⁵⁴ was auf eine allelische Imbalance und teilweise einem Re-Imprinting des maternalen Allels zurückzuführen ist und mit der Wiedererlangung des fötalen Expressionsmusters einhergeht.^{55, 56} In 43% der dysplastischen Knoten, 78% der

gut und 89% der mäßig differenzierten HCCs konnte eine dysregulierte Expression beider Allele nachgewiesen werden.⁵⁷

1.3 Proteinmodifikation und Proteindegradation

Die funktionelle Vielfalt des zellulären Proteoms kann durch kovalente, posttranslationelle Modifikationen deutlich ausgeweitet werden. Die Proteinmodifikation stellt dabei eine wichtige zelluläre Strategie dar, mit der die Zellen eines Organismus auf intrazelluläre, aber auch umweltbedingte Veränderungen reagieren können. Solche Modifikationen beinhalten kleine Moleküle wie Phosphat-, Methyl- oder Acetylreste, aber auch die Bindung an kleine Proteine wie Ubiquitin oder *ubiquitin-like proteins*.⁵⁸ Die Ubiquitylierung stellt dabei eine der wichtigsten Modifikationen zur Regulation von biologischen Funktionen dar. Es handelt sich hierbei um einen induzierbaren und reversiblen Prozess, welcher in die zelluläre Homeostase oder die Signaltransduktion involviert ist.⁵⁹⁻⁶¹

1.3.1 Ubiquitin-Proteasom-System

Das bekannte Ubiquitin-Proteasom-System stellt den wichtigsten selektiven Proteinabbaumechanismus einer eukaryontischen Zelle dar. Diese multikatalytische Protease ist nicht nur für die Degradation von kurzlebigen Proteinen, sondern auch für den Abbau von Proteinen mit einer hohen Halbwertszeit verantwortlich. Die Degradation von Substraten erfolgt durch spezifische Proteine, welche reversibel kovalent an diese gebunden werden. Am bekanntesten ist die Verknüpfung mit Ubiquitin, einem kleinen 8 kDa großen Protein, welches erstmals in einem *in vitro* System aus Retikulozytenextrakt untersucht wurde.⁶² Der biochemische Übertragungsprozess (Abbildung 2) von Ubiquitin-Molekülen auf das Substrat (Ubiquitylierung) ist durch das sequentielle Wirken dreier Enzymklassen charakterisiert.⁶³

In einer ATP-abhängigen Reaktion wird der Carboxylrest des C-terminalen Glycins von Ubiquitin durch ein spezifisches Aktivierungs-Enzym (E1) aktiviert. Bei diesem Schritt kommt es zur Ausbildung einer Thioesterbindung zwischen einem konservierten Cysteinrest des E1-Proteins und dem Ubiquitin.⁶⁴ In einer zweiten Reaktion wird das aktivierte Ubiquitin auf ein Cystein im aktiven Zentrum eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (*ubiquitin conjugating enzyme*, E2) übertragen.⁶⁵ Diese Enzyme benötigen in den meisten Fällen zusätzliche Faktoren, so genannte E3-Ligasen, um die spezifische

Ubiquitylierungsreaktionen vorzunehmen. E3-Enzyme katalysieren die kovalente Bindung von Ubiquitin an das Substrat über spezielle Interaktionsmotive der E3-Ligasen.

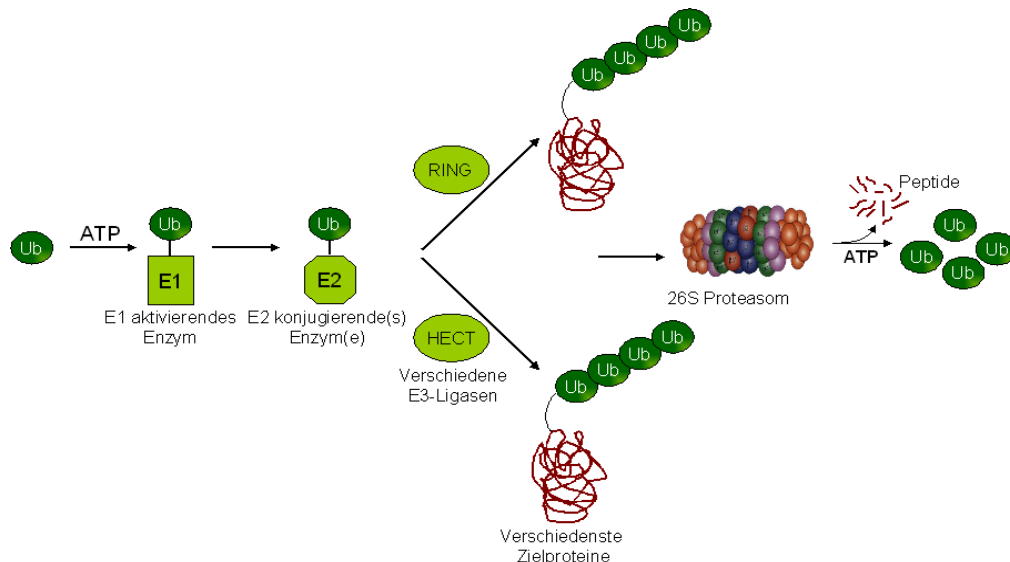


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Das E1-Enzym wird in einer ATP-abhängigen Reaktion mit Ubiquitin beladen. Dieses überträgt das aktivierte Ubiquitin auf ein E2-Enzym, welches den Ubiquitinrest wiederum an eine Ubiquitin-Ligase (E3) überträgt. Das E3-Enzym katalysiert die Bindung des Ubiquitin auf einen Lysinrest des Substrates. Durch das wiederholte Durchlaufen dieser Enzym-Kaskade werden die Substrate durch Ubiquitinketten polyubiquitiniert.

Die meisten bisher bekannten Ubiquitin-Ligasen kann man anhand bestimmter Sequenz-, Struktur- und Funktionsmerkmalen in zwei Hauptfamilien, die HECT (*Homologous to the E6-AP C-Terminus*) E3-Ligasen und die RING (*really interesting new gene*) Finger-E3-Ligasen, unterteilen. An das gebundene Ubiquitin werden im Folgenden weitere aktivierte Ubiquitinmoleküle angehängt, die entstandene Poly-Ubiquitinkette dient dem 26S Proteasom als Marker bei der Substraterkennung. Nach der Proteindegradation wird die freigewordene Ubiquitinkette ‚recycled‘ und die einzelnen Moleküle können in einem neuen Markierungsprozess wieder verwertet werden. Dafür sind zwei Enzyme verantwortlich, die Ubiquitin C-terminalen Hydrolase (UCH) und die Ubiquitin-spezifische Protease (UBP, auch Isopeptidase).⁶⁶

Das Ubiquitin-Proteasom-System folgt einem hierarchischen Aufbau, d.h. es gibt nur ein E1 Enzym, welches das Ubiquitin für die unterschiedlichsten nachfolgenden Konjugationen aktiviert. Es gibt dagegen verschiedene E2-Isoformen, bisher sind ca. 50 E2

Enzyme bekannt. Diese interagieren mit einer oder mehreren der über 500 beschriebenen E3 Isoformen. Jede E3-Ligase ist in der Lage verschiedenste Substrate, mit definierten strukturellen Ähnlichkeiten, zu erkennen und mit Ubiquitin zu markieren. E3-Ligasen sind daher wesentlich an der Spezifität des Ubiquitin-Systems beteiligt.

Das 26S Proteasom ist ein Multiprotein- und Multienzymkomplex und weist eine Größe von ca. 2000 kDa auf. Dieser Komplex erkennt spezifisch polyubiquitylierte Proteine und spaltet diese in kleine, 3-22 Aminosäuren große Peptide.⁶⁷ Das 26S Proteasom besteht aus einem katalytischen Zentrum, dem zentralen 20S Komplex und zwei regulatorischen 19S Komplexen.⁶⁸

1.3.2 Funktionen des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Die klassische Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems besteht in der Markierung und dem Abbau von Substraten, die unter physiologischen Bedingungen aus dem zellulären System entfernt werden sollen, aber auch fehlgefalteter Proteine. Aufgrund seiner zentralen Eigenschaften bei der Regulation der Bioverfügbarkeit von Faktoren spielt es eine wichtige Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse, z.B. durch den Abbau von Zellzyklusregulatoren, Transkriptionsfaktoren und Signalwegskomponenten. So nimmt das Proteasom-System durch den Abbau der Zellzyklusregulatoren Cyclin A, B, D und E, sowie des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p27 maßgeblichen Einfluss auf das Fortschreiten des Zellzyklus.⁶⁹

Die Ubiquitylierung dient jedoch nicht nur der Markierung von Proteinen für die effiziente Degradation, sondern auch zur proteasom-unabhängigen Modulation verschiedener zellulärer Kernfunktionen wie Replikation, Transkription und DNA-Reparatur (zusammengefasst in ⁷⁰). So wurde neben der kovalenten Modifizierung von Histonen durch Acetylierung oder Phosphorylierung gezeigt, dass die Histone H2A und H2B durch Monoubiquitylierung in ihrer Bioaktivität verändert werden.^{71, 72} Eine Ubiquitylierung des Histons H2B durch das E2-Enzym RAD6, spielt eine grundlegende Rolle in der Meiose.⁷³ Man vermutet, dass die Struktur der Histone durch die Ubiquitylierung beeinflusst und damit die Zugänglichkeit der Promotor-DNA für Transkriptionsfaktoren verändert wird. Des Weiteren wurde die Ubiquitylierung von Transkriptionsfaktoren beschrieben, welche die Aktivität der Transkription beeinflussen.⁷⁴ Ein Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor NFκB, der durch die Ubiquitylierung und anschließende Degradation seines Inhibitors IκB, frei vorliegt und in der Lage ist, in den Kern zu translozieren und seine Zielgene (z.B. p53,

RAS, IL2, c-myc oder c-myb) zu aktivieren (zusammengefasst in ⁷⁵). In diesem Zusammenhang ist eine Überexpression von NFκB bereits in mehreren Tumorentitäten beschrieben worden.⁷⁶⁻⁷⁸

1.3.3 Dysregulation der Proteolyse in der humanen (Hepato)karzinogenese

Die Dysregulation von Ubiquitin-Ligasen oder anderen Bestandteilen des Ubiquitin-Proteasom-Systems kann zur aberranten Akkumulation von Onkogenen oder einem reduzierten Abbau von Tumorsuppressorgenen führen, was häufig mit der Entwicklung von Tumoren assoziiert ist. Für die E1-Enzyme konnte bisher keine direkte Beteiligung an der Initiation und Progression von Tumoren nachgewiesen werden. Dem gegenüber stehen Berichte die belegen, dass wenige der bekannten E2-Enzyme und zahlreiche E3-Ligasen in den Prozess der Karzinogenese involviert sind. Wichtige E3-Ligasen mit nachweislicher protumorigener Funktion sind z.B. das MDM2 (transformed 3T3 cell double minute 2;⁷⁹) oder BRCA1 (breast cancer 1;⁸⁰). Eine Übersicht über bekannte, publizierte, tumor-relevante E3-Ligasen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Die E3-Ubiquitin-Ligase **MDM2** ist für die Ubiquitylierung und sich daran anschließenden proteasomalen Abbau von p53 verantwortlich. P53 wiederum reguliert seine Bioverfügbarkeit durch Aktivierung von MDM2.^{79, 81, 82} Eine Überexpression von MDM2 resultiert in einer Reduktion des Tumorsuppressorgen p53, was einen weiteren Mechanismus zur Inaktivierung des p53 in verschiedensten Tumorentitäten darstellt. MDM2 ist auf Chromosom 12q13-14 lokalisiert und in ca. 36% aller Sarcome überexprimiert.⁸³ Neben der Interaktion mit p53, stellt MDM2 auch ein wichtiges Zielgen des Ras-Raf-MAP-Kinase-Signalweges dar. Ras, ein beschriebenes Onkogen, trägt durch die Induktion von MDM2 zur Reduktion der p53-Aktivität und der daraus resultierenden Phänotypen verschiedener Tumoren bei.⁸⁴

Ein weiteres Beispiel für die Dysregulation einer tumor-relevanten E3-Ligase ist **BRCA1**. Das *BRCA1* Gen unterliegt sehr häufig heterozygoten Veränderungen in Familien mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung von z.B. Mammakarzinomen und Ovarialkarzinomen.⁸⁵ Zusammen mit dem Protein BARD1 bildet BRCA1 einen heterodimeren E3-Komplex, der für die Monoubiquitylierung von verschiedensten Histonen verantwortlich ist.^{86, 87} BRCA1 ist auf Chromosom 17q lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf DNA-Schädigung.⁸⁸ Darüber hinaus sind bisher keine Zielstrukturen von BRCA1 bekannt, welche im Falle einer Mutation akkumuliert vorliegen

und protumorigene Eigenschaften besitzen.

Ebenso haben molekulare Analysen des humanen HCC eine Vielzahl von genetischen und epigenetischen Veränderungen belegt, welche zu einer Funktionsänderung des Ubiquitin-Proteasom-Systems führen.⁸⁹ In diesem Zusammenhang wird der regulatorischen 26S Proteasom-Untereinheit **Gankyrin** eine frühe protumorigene Funktion in der Hepatokarzinogenese zugeschrieben. Analysen belegen eine Überexpression von Gankyrin in HCC Geweben im Vergleich zur normalen, gesunden Leber.⁹⁰ Durch Interaktionen von Gankyrin mit CDK4, wird die funktionelle Regulation von CDK4 durch p16 verhindert.⁹¹⁻⁹³ Diese Wirkung von Gankyrin auf CDK4 korreliert mit der Beobachtung, dass die erhöhte Expression von Gankyrin zur Hyper-Phosphorylierung von RB-1 und zu einer Freisetzung der E2F Transkriptionsfaktoren führt, was mit einer gesteigerten Tumorzellproliferation assoziiert ist.⁹¹ Des Weiteren konnte auch eine Interaktion mit MDM2 nachgewiesen werden, welche sekundär auf die Expression von p53 in Tumorzellen wirkt.⁹⁴ Diese Interaktion erhöht die Bindung von MDM2 mit p53, wodurch es zu einer gesteigerten Ubiquitylierung und verstärkten proteasomalen Degradation von p53 kommt.⁹⁴

Darüber hinaus konnten auch funktionell relevante Expressionsänderungen von E3-Ubiquitin-Ligasen im HCC nachgewiesen werden. Die Ubiquitin-Ligase **Parkin**, ein potentiell Tumorsuppressorgen, wurde als Produkt des *PARK2* (Parkinson disease protein 2) Gens charakterisiert. Beschriebene Interaktionspartner von Parkin sind SYT11, CCNE1, GPR37 oder STUB1. Es wurden bereits funktionsinaktivierende Mutationen in diesem Gen bei Parkinsonerkrankungen beschrieben.⁹⁵ Der *PARK2* Genlocus ist auf dem Chromosomenarm 6q26, in einem genomischen Bereich lokalisiert, welcher extrem instabil ist. Dieser chromosomale Abschnitt ist in verschiedenen Tumorentitäten, einschließlich des HCCs, als häufig deletiert beschrieben worden.⁹⁶ In Expressionsstudien wurde eine Reduktion der *PARK2* Expression in 50% der analysierten HCCs beobachtet. In entsprechenden HCC Zelllinien führt die Überexpression zu einer Reduktion des Zellwachstums.⁹⁷ Parkin wirkt des Weiteren, als Bestandteil eines Skp1-Cullin-F-box-ähnlichen Ubiquitin-Ligase-Komplex, durch die Degradation von Cyclin E auf den Zellzyklus und die Apoptose von Zellen. Eine Überexpression von Parkin führt demnach zu einer verstärkten Degradation von Cyclin E und vermindert die Apoptoserate der Zellen.⁹⁸

Tabelle 1: Beschriebene E3-Ligasen im Prozess der humanen KarzinogeneseTabelle modifiziert dargestellt nach ¹⁰² und ¹⁰³.

E3-Ligasen	Substrat(e)	Biologische Funktion(en)	Alterationen
E6-AP	p53	Apoptose	Infektion von HPV bei Gebärmutterhalskrebs
Huwe1	p53	Apoptose, Wachstumsarrest	Überexpression in Mamma-, Lungen- und kolorektalen Karzinomen
EDD	TopBP1	DNA Schädigung	Amplifikation und Überexpression in Mamma- und Ovarialkarzinomen
Nedd4-1	PTEN, Hgs, Eps15	Apoptose, Genomintegrität, Endocytose	Überexpression in Blasen- und Prostatakarzinom
Nedd4-2	Smad2, Smad4, TβR-I/II	Apoptose, Wachstumsarrest	-
Itch	P73, p63, Notch1, c-Jun	Apoptose, Differenzierung	-
WWP1	P53, Notch1, KLF2, KLF5, Smad2, Smad4, TβR-I/II	Apoptose, Wachstumsarrest	Amplifikation und Überexpression in Mamma- und Prostatakarzinomen
Smurf1	Smad1, Smad4, Smad5, TβR-I/II, BMP-RI/II	Apoptose, Wachstumsarrest	Amplifikation und Überexpression in Pankreaskarzinom
Smurf2	Smad1, Smad2, Smad4, Smad5, TβR-I/II	Apoptose, Wachstumsarrest	Überexpression in Ösophaguskarzinom
ARF-BP1	P53, Mc11	Zellwachstum, Apoptose	Überexpression in Mammakarzinom
MDM2	p53	Apoptose	Amplifikation, Mutation, Überexpression in Mammakarzinom
RNF11	AMSH	Signaltransduktion	Überexpression in Mammakarzinom
EFP	14-3-3σ	Zellzyklus	Überexpression in Mammakarzinom
Skp2	p27, p21, FoxO1	Zellzyklus, Transkription	Amplifikation und Überexpression in Mammakarzinom
β-TrcP	IκB, β-Catenin, CDC25A	Zellzyklus, Transkription	Amplifikation und Überexpression in Mammakarzinom
Cul4A	DDB2, Jun	Apoptose, DNA Reparatur	Amplifikation und Überexpression in Mammakarzinom
BRCA1	H2A, Rpb-1, γ-tubulin	DNA-Reparatur, Genomintegrität	heterozygoten Veränderungen in Mamma- und Ovarialkarzinomen
Fbw7	Cyclin E, Myc, Notch	Zellzyklus	Mutationen in Mammakarzinom
CHFR	Plk1, Aurora A	Zellzyklus	Expressionsverlust durch Promotor-methylierung im Mammakarzinom

Abkürzungen: **AMSH** (Associated molecule with the SH3 domain of STAM); **CDC25A** (cell division cycle 25 homolog A); **CHFR** (checkpoint with forkhead and ring finger domains); **DDB2** (damage-specific DNA binding protein 2); **EFP** (Estrogen-responsive finger protein); **Fbw7** (F-box/WD repeat-containing protein 7); **Hgs** (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate); **KLF** (Kruppel-like factor); **Nedd** (neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene); **Plk1** (polo-like kinase 1); **RNF** (ring finger protein); **RPB-1** (RNA polymerase II subunit B1); **Smad** (mothers against DPP homolog (Drosophila)); **Smurf** (Smad ubiquitylation regulatory factor); **TβR** (transforming growth factor (TGF)-β receptor); **WWP1** (WW domain-containing protein 1)

Die Ubiquitin-Ligase **SIAH-1** wurde als p53-abhängiges Gen beschrieben, die während der Apoptose induziert vorliegt.⁹⁹ *In vitro* Studien haben eine Wechselwirkung von SIAH-1 mit APC und dessen Einfluss auf den proteasomalen Abbau von β -Catenin beschrieben.¹⁰⁰ Somit wird für SIAH-1 eine direkte Beteiligung an der humanen Karzinogenese diskutiert. Des Weiteren konnten LOH (*loss of heterozygosity*) und cDNA-Micro-Array Analysen eine deutliche Reduktion der Ubiquitin-Ligase in ca. 30% aller HCCs zeigen, was antiapoptotische Effekte auf die Tumorzelle vermuten lässt.^{52, 101} Über die biologischen Funktionen von SIAH-1 (und dem zweiten Familienmitglied SIAH-2) oder die funktionelle Relevanz der reduzierten SIAH-1 Expression im Rahmen der Hepatokarzinogenese ist jedoch bisher nichts bekannt.

1.4 *Seven in absentia* homologue (SIAH)

Die humanen SIAH Proteine (SIAH-1 und SIAH-2) sind die Homologe des *seven in absentia* (SINA) Proteins aus *Drosophila melanogaster* und gehören zu einer konservierten E3-Ubiquitin-Ligase-Familie. SINA wurde 1990 identifiziert und spielt eine wichtige Rolle bei der Formation von R7 Photorezeptorzellen in der Entwicklung des Auges.¹⁰⁴ Dabei nimmt SINA eine essentielle Rolle bei der Signaltransduktion „downstream“ des Tyrosinkinaserzeptors *sevenless* und Ras-1 ein.^{105, 106} Daneben sind auch für andere Tierarten homologe Proteine beschrieben worden (*M. musculus*: mSIAH-1A, mSIAH-1B und mSIAH-2, *Xenopus laevis*: XSIAH-2 und Zebrafisch (*zebra danio*): SIAZ). Trotz der stammesgeschichtlichen Entfernung der verschiedenen Arten sind die Aminosäuresequenzen der SIAH-Familienmitglieder hoch konserviert, was für basale und evolutionär früh entwickelte Funktionen im Rahmen der Zellhomöostase spricht. So zeigt SIAH-1 auf Aminosäureebene eine Homologie von 76% zu SINA und 91,4% zu SIAZ.¹⁰⁷ SIAH-2 zeigt eine Homologie von 68% zu SINA und 77% zu SIAH-1.¹⁰⁸ Allen Proteinen ist gemeinsam, dass sie sich durch eine N-terminale RING-Domäne und eine C-terminale Substrat-Bindungsdomäne auszeichnen (Abbildung 3). Durch die Substrat-Bindungsdomäne sind sie in der Lage mit verschiedenen Substraten und mit den in der Ubiquitylierung beteiligten Proteinen zu interagieren. Zu den regulatorisch wirkenden Interaktionspartnern gehören im SCF (*Skp1-Cul1-F-box*)-Komplex bspw. die Proteine SKP1 (*S-phase kinase-associated protein*) und SIP (*Siah interacting protein*).¹⁰⁹ Für SIAH-1 und SIAH-2 sind bis heute mehr als 50 Bindepartner beschrieben worden, welche verschiedenste zelluläre Prozesse unter physiologischen und pathologischen

Bedingungen beeinflussen.¹¹⁰ Hierbei wurden für beide SIAH Proteine sowohl exklusive als auch redundante Interaktionspartner/Substrate beschrieben (z.B. TIEG-1 (*Transforming growth factor-beta-inducible early growth response protein 1*; Transkriptionsrepressor) für SIAH-1, Vav1 (Onkogen) für SIAH-2 oder OBF-1 (*OCT-binding factor 1*; Transkriptions-Coaktivator) für beide Ligasen). Diese unterschiedlichen und gemeinsamen Bindungspräferenzen verdeutlichen die Möglichkeit einer gemeinsamen, aber auch exklusiven Einflussnahme auf essentielle zelluläre Prozesse.

Neben der Polyubiquitylierung durch SIAH-1 und SIAH-2, wie beschrieben für DCC (*deleted in colorectal cancer*,¹¹¹), N-CoR (Corepressor,¹¹²) oder c-Myb (Transkriptionsfaktor,¹¹³) und dem sich anschließenden proteasomalen Abbau, sind auch proteasom-unabhängige Effekte auf Substrate beschrieben worden (publiziert für z.B. BAG-1 (*BCL2-associated athanogene*,¹¹⁴) oder CtIP.¹¹⁵ Aufgrund der zentralen Stellung der SIAH Moleküle in der Regulation der Bioverfügbarkeit von tumor-relevanten Substraten, ist davon auszugehen, dass die veränderte Expression von SIAH-1/-2 auch Einfluss auf die zellulären Prozesse von HCC-Zellen nimmt.

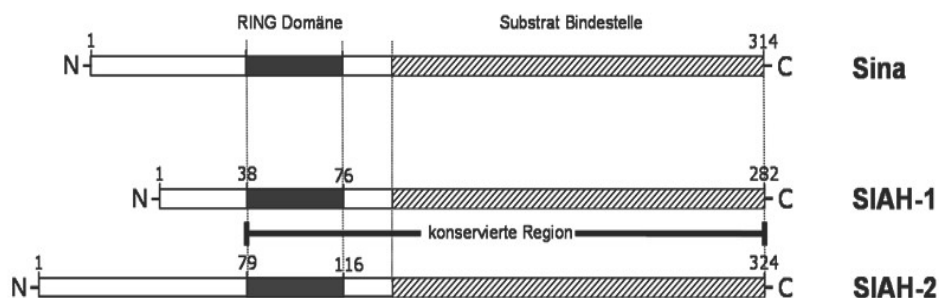


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Ubiquitin-Ligasen SIAH-1 und SIAH-2.

Aufbau der E3-Ligase SINA (*seven in absentia*, aus *Drosophila melanogaster*) und der humanen Homologe SIAH-1 und SIAH-2.¹¹⁰ Allen Proteinen ist gemeinsam, dass sie sich durch eine N-terminale RING-Domäne und eine C-terminale Substrat-Bindungsdomäne auszeichnen.

1.5 Zielsetzung

Das hepatozelluläre Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC) ist eine der weltweit häufigsten Tumorerkrankungen. Da zum Zeitpunkt der Diagnose bei den meisten Patienten ein fortgeschrittenes, inkurables Tumorstadium vorliegt, sind insbesondere das Verständnis der Progressionsmechanismen und ihre potentielle therapeutische Beeinflussung von zentraler wissenschaftlicher Bedeutung. Neben der häufig beschriebenen Dysregulation von Syntheseprozessen (z.B. auf transkriptioneller Ebene),

welche häufig zu einer Veränderung der Expression von tumor-relevanten Genen (z.B. Onkogenen) führen, stellt auch der aberrante Abbau von Proteinen einen potentiellen protumorigenen Mechanismus dar.

Die Dysregulation zahlreicher Komponenten des proteasomalen Abbaus (insbesondere der Ubiquitin-Ligasen) ist häufig mit der Entwicklung von Malignomen assoziiert. Für das HCC konnte bisher jedoch nur in wenigen Fällen ein Zusammenhang zwischen dem aberranten Abbau von Substraten und der Hepatokarzinogenese hergestellt werden. So wurde die Expression der E3-Ubiquitin-Ligase SIAH-1 (*seven in absentia homologue-1* aus *Drosophila*) als häufig reduziert im HCC beschrieben. Über die funktionelle Relevanz, die Regulation und die relevanten Effektormechanismen der SIAH-Familienmitglieder (SIAH-1 und SIAH-2) ist im Rahmen der Hepatokarzinogenese jedoch nur wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher SIAH-1 und SIAH-2 hinsichtlich der Expression und zellulären Lokalisation in humanen HCC Geweben und Zelllinien zu analysieren. Der Einfluss beider Ligasen auf funktionelle Aspekte des Tumorwachstums und der Tumorzellmigration sollte geklärt und relevante molekularen Effektormechanismen identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Lösungen, Chemikalien und Kits

BrdU-Proliferations-ELISA	Amersham Bioscience (Freiburg)
Celebrex (Wirkstoff Celecoxib)	Pfizer (Karlsruhe)
Dynamic ET Terminator Sequencing Kit	GE Healthcare (Freiburg)
ECL plus Western Blotting Detektionssystem	Amersham Bioscience (Freiburg)
Einwegpipetten, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg) Greiner (Nürtingen) ABImed (Langenfeld)
Enzyme und Puffer, dNTPs und <i>Random</i> -Primer	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Filme (Western Blotting)	Kodak (Stuttgart) Roche (Mannheim)
HGF (<i>Hepatocyte Growth Factor</i>)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche (Mannheim)
Medien und Zusätze für die Zellkultur	PAA Laboratories (Cölbe)
MG132 (Proteasom-Inhibitor)	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel (Düren)
Nutlin-3 (MDM-2 Inhibitor)	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
Plastikware Zellkultur	Greiner (Nürtingen) Falcon (Heidelberg) Nunc™ (Wiesbaden) TPP (Basel, Schweiz)
Qproteome Cell Compartment Kit	QIAGEN (Hilden)
Standardchemikalien (soweit nicht anders vermerkt)	Bio-Rad (München) BD-Bioscience (Heidelberg) Merck (Darmstadt) Roche (Mannheim) Roth (Karlsruhe) Sigma (Deisenhofen)
TaqMan Sonden-Master Mix	ABgene (Epsom, United Kingdom)
ultraPure™ RNase freies Wasser für molekulare Analysen	Invitrogen (Karlsruhe)

VenorGeM, Mycoplasma-Detektions Kit	Minerva Biolabs (Berlin)
Vitalitäts-Test (MTT-Test)	EZ4U, Biomedica (Wien, Österreich)
	M2128, Sigma (Deisenhofen)
Vollentsalztes Wasser für Lösungen (Reinstwassersystem Ultra Clear/Integra)	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation (Barsbüttel)
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, (Burlingame, USA)
Streptavidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, (Burlingame, USA)
Vectastain ABC Standard Kit	Vector Laboratories, (Burlingame, USA)

2.2 Geräte

ABI Prism 7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt)
ABI-377 DNA Sequencer	Applied Biosystems (Darmstadt)
Agarosegelelektrophorese System	Keutz (Reiskirchen)
CO ₂ -Inkubatoren (Hera cell 150)	Heraeus (Hanau)
ELISA-Reader (Multiscan Ascent)	Thermo Electron Corporation (Dreieich)
Entwicklermaschine (Optimax Typ TR)	MS Laborgeräte (Heidelberg)
FACS Calibur™	BD Bioscience (Heidelberg)
FluorChem-Imaging System WB	Alpha Innotech/Biozym (Oldendorf)
Geldokumentationssystem (Alpha Imager™)	Biozym (Oldendorf)
Inverse Mikroskop Olympus CKX41	Olympus (Hamburg)
Inverses Mikroskop (Axiovert 25)	Zeiss (Jena)
Kamera Altra 20 (Soft Imaging System)	Olympus (Hamburg)
Lamina Flow (Microflow)	Nunc™ (Wiesbaden)
Microfuge Micro 200	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Microfuge Micro 200	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Microwelle	Panasonic (Hamburg)

Nanodrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
PAA-Gelelektrophorese System	Biozym (Oldendorf)
PCR Block (Multi Cyclor PTC)	Biozym (Oldendorf)
pH-Meter (pH 210 Microprocessor pH Meter)	Hanna Instruments (Kehl am Rhein)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Schüttel-Thermoblock	Eppendorf (Hamburg)
Spektrales Laser-Scanning-Konfokalmikroskop TCS SL	Leica (Wetzlar)
Taumelschüttler (Biometra WT17)	Biometra (Göttingen)
Western Blot Apparatur (LKB Multiphor II)	Pharmacia/Pfizer Pharma (Karlsruhe)
Western Blot Apparatur (WetBlot)	Biozym (Oldendorf)
Zellkulturzentrifuge Universal R32	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Zentrifuge Varifuge 3.0/3.OR	Heraeus/Kendro (Hanau)

2.3 Software

AnalySIS getIT Vers. 5.0	Olympus (Hamburg)
Axio Vision Rel. 4.6	Zeiss (Jena)
CellQuest Pro	BD Bioscience (Heidelberg)
EndNote X0.2	Thomson ResearchSoft (Carlsbad, USA)
GenePix Pro 6.0 Microarray Image Analysis Software	Molecular Devices / Axon Instruments (Union City, USA)
<i>Modfit Lt™</i>	BD Bioscience (Heidelberg)
SPSS 16.0 Software	SPPS (Chicago, USA)
TMA Lab	Aperio Technologies (Vista/CA, USA)

2.4 Antikörper

Tabelle 2: Erstantikörper

Antigen	Produkt/ Hersteller	Ig Klasse	Eingesetzte Verdünnung	
			WB	IHC/IF
Aktin	Ab-1/MP Biomedicals	Maus (monoklonal)	1:10000	-
BAG-1	3.10G3E2/ Santa Cruz Biotechnology	Maus (monoklonal)	1:1000	-
E-Cadherin	5H9/ Progen	Maus (monoklonal)	1:1000	-
FBP1/2	N15/Santa Cruz Biotechnology	Ziege (polyklonal)	1:500	-
FBP3	E15/ Santa Cruz Biotechnology	Ziege (polyklonal)	1:2000	-
PUF60 (FIR)	Affinity BioReagenz	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	-
MIB-1 (Ki67)	M7240/Dako	Maus (monoklonal)	1:1000	-
p21	BD Pharmingen	Maus (monoklonal)	1:1000	-
p53	554293/BD Pharmingen	Maus (monoklonal)	1:10000	-
PARP	95422/Cell Signaling	Kaninchen polyklonal	1:200	-
SIAH-1	N15/Santa Cruz Biotechnology	Ziege (polyklonal)	1:500	-
SIAH-1	Cosmo Bio Co., LTD	Kaninchen (polyklonal)	-	1:100
SIAH-2	G16 und N14/ Santa Cruz Biotechnology	Ziege (polyklonal)	1:1000	-
SIAH-2	Cosmo Bio Co., LTD	Kaninchen (polyklonal)		1:100
T-Star (SLM2)	M20/ Santa Cruz Biotechnology	Ziege (polyklonal)	1:1000	-
α -Tubulin	B7/ Santa Cruz Biotechnology	Maus (monoklonal)	1:2000	1:100
β -Catenin	BD Bioscience	Maus (monoklonal)	1:2000	-

Tabelle 3: Zweitantikörper

Antigen	Produkt/ Hersteller	Ig Klasse	Eingesetzte Verdünnung	
			WB	IHC/IF
Anti Kaninchen (HRP-gekoppelt)	#7074/Cell Signaling	-	1:2500	-
Anti Maus (Alexa 488-gekoppelt)	A11029/ MoBiTec	-	-	1:200
Anti Maus (Biotin-gekoppelt)	E0354 / Dako	Kaninchen (polyklonal)		1:2000
Anti Maus (HRP-gekoppelt)	#7076/Cell Signaling	-	1:2500	-
Anti Ziege (Biotin-gekoppelt)	E0466 / DAKO	Kaninchen (polyklonal)		1:2000
Anti Ziege (Cy3-gekoppelt)	Dianova	-	-	1:500
Anti Ziege (HRP-gekoppelt)	P0449/ DAKO	-	1:2000	-

2.5 Oligonukleotid- und siRNA Sequenzen

Die Synthese der Primer für die PCR wurde von der Firma Thermo Electron Corporation (Ulm) durchgeführt. Die Konzentration der Primerstocklösung betrug 100 μ M, in den PCR-Reaktionen wurde eine Arbeitskonzentration von 10 μ M eingesetzt. Um die Amplifikation geringer genomischer Kontaminationen zu erkennen, wurden die Primer für die mRNA-Expressions-Analysen Intron-übergreifend, d.h. auf zwei angrenzende Exone gelegt.

Für die Durchführung semiquantitativer Analysen von SIAH-1 und SIAH-2 wurde ein kommerzielles Primer/Sonden-Gemisch verwendet. Der Abgleich erfolgte gegen 18S ribosomale RNA. Die hierfür verwendeten Primer und die Sonde wurden entsprechend folgender Kriterien ausgewählt.¹¹⁶

Die siRNA-Sequenzen wurden unter Verwendung der Design-Tools der Firma Dharmacon erstellt. Bis auf die nonsense siRNA (Qiagen, Hilden) wurden alle siRNAs durch die Firma

MWG (Ebersberg) synthetisiert. Alle siRNAs hatten eine Länge von 19 Nukleotiden und einen GC-Gehalt von 30-52%. Um eine höchstmögliche Genspezifität zu gewährleisten, wurden keine Treffer unter 18 Nukleotide Homologie gewählt. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Sequenz keine drei aufeinander folgende gleiche Basen besaß und am 3' Ende zwei überhängende Thymidinbasen trug. Die nonsense siRNA wies nach dem Abgleich mit dem humanen Genom keine Homologie zu humaner cDNA oder gDNA auf.

Tabelle 4: Primer- und siRNA-Sequenzen

qRT-PCR	qRT-PCR for 5' - 3'	qRT-PCR rev 5' - 3'
18S ribosomal RNA	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA
18S ribosomal RNA - Sonde	FAM-AGC AGG CGC GCA AAT TAC CC-TAMRA	
SIAH-1	Applied Biosystems (Forste City, USA); TaqMan® Gene Expression Assay: Hs00361785_m1	
SIAH-2	Applied Biosystems (Foster City, USA); TaqMan® Gene Expression Assay: Hs00192581_m1	
PCR-Primer	Primer for 5' - 3'	Primer rev 5' - 3'
p21	CAG CAG AGG AAG ACC ATG TG	GGA TTA GGG CTT CCT CTT GG
18S ribosomal RNA	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA
siRNAs	Sense 5' - 3'	Antisense 5' - 3'
SIAH-1	gcucacauguuguccaacu-dTdT	gguggacaacaugugagc-dTdT
SIAH-2	caucgucuuucuagcuaca-dTdT	uguagcuagaaagacgaug-dTdT
nonsense 1	uucccgaacgugucacgu-dTdT	acgugacacguucggagaa-dTdT

2.6 Zellkulturmedien, Lösungen und Zellkulturzusätze

Die hier aufgeführten Produkte wurden, sofern nicht anders angegeben, alle von der Firma PAA (Cölbe) bezogen.

Produkt	Inhaltsstoffe, Verwendung
DMEM, Dulbecco's modified Eagle's Medium mit L-Glutamin	Glukose (4,5 g/l), mit L-Glutamin, Kultivierung der HuH7-Zellen
DMSO (AppliChem)	Zusatz zur Kryokonservierung der Zelllinien und Lösungsmittel für Medikamentenapplikation

FCS, Fötales Kälberserum	Zusatzstoff für Zellkulturmedien
MEM, Modified Eagle's Medium mit $\text{Na}_2(\text{CO}_3)_2$	mit Earle's Salt und L-Glutamin, Kultivierung der Hep3B-Zellen
Oligofectamin (Invitrogen)	Kationischer Carrier zum Transfizieren der siRNA
OptiMEM (Gibco)	Medium für die siRNA Transfektion
Penicillin-Streptomycin-Antibiotika-Lösung	10.000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin, als antibakterieller Zusatz zum Kulturmedium
Puromycin	1,5 µg/ml Puromycin als antibakterieller Zusatz zum Kulturmedium
RPMI, Roswell Park Memorial Institute	mit L-Glutamin, Kultivierung der HepG2-Zellen
Trypsin-EDTA-Lösung	0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA, zum Ablösen und Passagieren der Zellen

2.7 Zelllinien

Bei den 6 verschiedenen Zellkulturlinien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, handelte es sich um immortalisierte, humane Linien, die aus kultivierten Zellen hepatozellulärer Karzinome etabliert wurden.

Die Zelllinie Hep3B entstammte dem Tumorgewebe eines HBV-positiven Kindes afrikanischer Abstammung. Das Genom der Zelle enthält subgenomische Integrate des HBV-Virus, welche jedoch nicht in der Lage sind, infektiöse Viruspartikel zu bilden. (Artikelnummer: ACC93) Die Zelllinie HepG2 wurde aus dem Hepatoblastom eines 15-jährigen argentinischen Kindes generiert. (Artikelnummer: ACC180) Beide Linien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Aus dem Tumor eines 24-jährigen männlichen Mosambikaners entstammt die Zelllinie PLC/PRF/5. (Artikelnummer: JCRB0406) Diese Zellen exprimieren das Hepatitis B Oberflächen Antigen (HbsAg). Die Zelllinie HuH-7 wurde von einem 57 Jahre alten japanischen Mannes gewonnen. (Artikelnummer: JCRB0403) Diese Linien wurden von der *Japanese Collection of Research Bioresources* bezogen. Die temperatursensitiven Zellen 4Bv entstanden durch stabile Transfektion von Hep3B Zellen mit einem Vektor, der für die murine Isoform einer temperatursensitiven p53 Mutante (p53val135) kodiert. Als Kontrollzelllinie dienten die BT-2E Zellen, welche nur das entsprechende Resistenzgen

(Puromycin) trugen. Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Moshe Oren, Rehovot, Israel zu Verfügung gestellt.¹¹⁷

2.8 Zellkultur

2.8.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärent wachsende Zellen, welche in Petrischalen oder Mehrlochplatten kultiviert wurden. Die Zelllinien wurden stets bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% bei gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die Versuche mit dem temperatursensitiven Zellsystem wurden sowohl die 4Bv als auch die BT-2E Zellen nach der Aussaat in DMEM-Medium (ohne Puromycin) über Nacht im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach einem Mediumwechsel (mit Puromycin) für 24 Std. bei 32°C (permissive Temperatur) kultiviert. Nur unter diesen Bedingungen nimmt die Mutante eine transkriptionell aktive Konformation an, welche dem wildtypischen p53 ähnelt.

Alle verwendeten Zellen wurden in ihrem entsprechenden Medium (siehe 2.6) unter Zusatz von 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin Lösung kultiviert. Bei einer Zelldichte von ca. 90% wurden die Zellen passagiert. Um die Zellen von der Plastikoberfläche abzulösen, wurde der Kulturüberstand vollständig entfernt und die Zellen anschließend mit einer dem Kulturschalendurchmesser angemessenen Menge an Trypsin/EDTA Lösung überschichtet. Die mit Trypsin/EDTA bedeckten Zellen wurden für 5-10 Minuten im Brutschrank inkubiert, nachfolgend in ein Falcontube mit dem gleichen Volumen des entsprechenden Mediums überführt und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet im Medium resuspendiert. Aus der Zellsuspension wurde ein entsprechendes Aliquot (1/3 bis 1/7 zum Passagieren) entnommen, in ein frisches Kulturgefäß mit neuem Medium überführt und im Brutschrank weiter kultiviert. Verschiedene durchgeführte Experimente erforderten variierende Zellzahlen pro Kulturschale. Dafür wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Zählkammer nach Neubauer pipettiert und gezählt. Die Zellzahl/Milliliter wurde nach folgender Formel ermittelt.

$$\text{Zellzahl / Milliliter} = \frac{\sum \text{Zellzahl der Eckquadrate}}{4} \cdot 10^4$$

2.8.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien

Für die Kryokonservierung wurde, dass nach Zentrifugation erhaltene Zellpellet (siehe 2.8.1) einer zu 90% konfluenten 10 cm Zellkulturschale, in 1,8 ml des entsprechenden Kulturmediums, welches mit 10 % DMSO versetzt war, resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend in ein Kryovial (Greiner) überführt und sofort eisgekühlt. Anschließend wurde die Suspension langsam auf -70°C gekühlt (Abkühlung von ca. 10°C pro Stunde) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das Reaktionsgefäß aus dem Stickstofftank entnommen und zügig auf 37°C erwärmt. Die Zellsuspension wurde dann in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt, um das zytotoxische DMSO schnellstmöglich zu verdünnen. Nach Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 Minuten), konnte der Überstand verworfen und die Zellen in normalem Medium resuspendiert und kultiviert werden (siehe 2.8.1).

2.8.3 Kontaminationsbestimmung

Es erfolgte eine regelmäßige lichtmikroskopische Kontrolle auf Kontaminationen durch Bakterien und Pilze. Zur Testung auf Mycoplasmen wurden die Zellen in Abständen von 3 Monaten unter Verwendung des Mycoplasmen-Detektionskits VenorGeM (Minerva Biolabs) auf Kontaminationen hin untersucht. Hierzu wurde der Kulturüberstand auf das Vorhandensein von Mycoplasmen-DNA mittels PCR (siehe 2.9.7) überprüft. Bei der Durchführung des Tests wurden die Angaben des Herstellers befolgt, als Polymerase diente die Taq-Polymerase der Firma SIGMA. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen waren negativ auf Mycoplasmen-DNA.

2.8.4 Transiente *small-interfering* RNA (siRNA)-Transfektion

Für die transiente Transfektion mit gen-spezifischer small-interfering RNAs (siRNA) wurde die kationische Trägersubstanz Oligofectamin (Invitrogen) verwendet. Die Anlagerung der Kationen an die RNA bewirkte einen Verlust ihres hydrophoben Charakters, wodurch die RNA in die Lage versetzt wurde, durch die Zellmembran zu diffundieren.

Abhängig von der notwendigen Zellzahl für die sich anschließenden Analysen erfolgte die Transfektion auf 6-Well oder 6 cm Platten (Vitalitätstest 2.11.1, Proliferation 2.11.2, FACS-Analyse 2.11.3, Migrationsassay 2.11.4, Klonogenitätsassay 2.11.5, Proteinisolierung 2.10.1, RNA-Isolierung 2.9.3). Da die Fläche einer 6-Well Platte der Hälfte der Fläche einer

6 cm Platte entspricht, wurden die einzelnen Komponenten bei der Transfektion im 6-Well Format halbiert.

Für die Transfektion in 6 cm Platten wurde die Zellzahl abhängig von der Zelllinie ausgesät. So wurden für HepG2 3×10^5 , Hep3B und HuH7 $1,5 \times 10^5$ pro Platte in Antibiotika freiem Medium ausgesät. Die Transfektion mit siRNA wurde am folgenden Tag unter Verwendung des nachstehenden Protokolls durchgeführt.

Tabelle 5: Pipettierschema der Transfektion mit synthetischen siRNAs

Probe		siRNA-Behandlung [μl]	Unbehandelte Kontrolle [μl]
Lösung A	OptiMEM	15	-
	Oligofectamin	3	-
Lösung B	OptiMEM	185	-
	siRNA [20 μM]	0,5	-
Lösung A und B bei RT für 10 Minuten inkubieren			
Lösung A und B mischen und weitere 20 Minuten bei RT inkubieren			
OptiMEM vorlegen		800	1000
Gemisch Lösg. A/B (200 μl) auf Zellen verteilen			

Das Transfektionsvolumen betrug 1 ml (6 cm Schale). In einem Reaktionsgefäß wurden 3 μl Oligofectamin in 15 μl OptiMEM (Lösung A), in einem anderen Reaktionsgefäß 5nM siRNA in 185 μl OptiMEM (Lösung B) verdünnt und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Bei Doppelinhibierungen von 2 Genprodukten wurden je 5nM siRNA-#1 und siRNA-#2 mit OptiMEM verdünnt. Nach dem Ansetzen beider Lösung erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurden 800 μl OptiMEM auf die Zellen pipettiert (Kontrolle: 1000 μl OptiMEM) und 200 μl der Transfektionslösung zugefügt. Nach 4-stündiger Kultivierung bei 37°C im CO₂-Inkubator erfolgte die Zugabe von 3 ml Medium. Am nächsten Tag wurde das Medium vollständig gewechselt oder die Zellen für Versuche trypsinisiert und entsprechend der benötigten Zellzahl ausgesät (siehe 2.8.1).

2.8.5 Behandlung mit Chemotherapeutika und PGE₂

Cisplatin (cis-Diammineplatinum(II)dichloride) ist ein Chemotherapeutikum, welches die

Hemmung der DNA-Synthese mit nur kurzfristiger RNA- und Proteinsynthesehemmung bewirkt. Es wurde in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0,1 mM; 1 mM; 10 nM.

Vinblastin ist ein Chemotherapeutikum und gehört zur Gruppe der Vincaalkaloiden. Es bindet an das Protein Tubulin und hemmt somit die Ausbildung von Mikrotubuli. Es wurde in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0,1 mM; 1 mM; 10 nM.

Paclitaxel (Taxol) ist ein Wirkstoff, dessen biologische Wirkung auf der Störung der Mitose beruht, in dem es im Rahmen der Verkürzung der Mitosespindeln und chromosomalen Segregation den Abbau der Mikrotubuli inhibiert. Es wurde in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0,1 mM; 1 mM; 10 nM.

Doxorubicin (10-(4-amino-5-hydroxy-6-methyl-oxan-2-yl)oxy-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-9,10-dihydro-7H-tetracene-5,12-dione) ist ein Wirkstoff und gehört zu der Stoffklasse der Anthracyclinen. Es gehört zur Wirkstoffgruppe der Interkalantien. Es bindet nichtkovalent an die DNA und verhindern die Anbindung der Polymerasen, wodurch die Zellteilung und Zellfunktion gestört wird. Es wurde in einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt.

2.8.6 Behandlung mit Inhibitoren

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen, niedermolekularen Substanzen (MG132, Nutlin-3) behandelt. Der „*small molecule inhibitor*“ Nutlin-3 stellt einen kompetitiven Inhibitor der MDM2-TP53 Interaktion dar.¹¹⁸ Nutlin-3 wurde nach Herstellerangaben in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und als 3,5 mM Stocklösung bei -20°C gelagert. Für die Behandlung von HepG2 Zellen mit Nutlin-3 wurden 4×10^5 Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit verschiedenen Nutlin-3 Konzentrationen (4 μ M, 8 μ M und 12 μ M) für 24 Std. in frischem Kulturmedium mit FCS und ohne Antibiotika.

MG132 ist ein potenter, zellpermeabler und selektiver Proteasom-Inhibitor, wodurch die proteasomal vermittelte Degradation von Proteinen massiv inhibiert wird. MG132 wurde nach Angaben des Herstellers in DMSO gelöst und eine 1 mM Stocklösung angesetzt. Für nachfolgende Behandlungen wurden 2×10^5 Zellen ausgesät und diese für 12 und 24 Std. mit 5 μ M MG132 behandelt.

2.9 Nukleinsäure-Techniken

2.9.1 siRNA Annealing

Die siRNAs wurden als einzelsträngige *sense* und *antisense* RNA-Moleküle lyophilisiert

geliefert. Die Lyophilisate wurden zu einer 100 µM Stocklösung resuspendiert, aliquotiert und bei -70°C gelagert. Bevor sie für die einzelnen Experimente eingesetzt werden konnten, mussten die RNA-Einzelstränge zu dsRNA zusammengefügt (*annealed*) werden. Hierfür wurden je 100 µl Aliquots sense und antisense RNA mit 50 µl 5 x *Annealing-Buffer* gemischt und bei 96°C für 2 Minuten im Thermoblock erhitzt. Der Block wurde anschließend abgeschaltet und die Lösung kühlte für 1 Std. im Thermoblock auf ca. 37°C herunter. Bei der Abkühlung kam es zur Anlagerung der komplementären Sequenzen und zur Bildung der doppelsträngigen siRNA. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

5x Annealing-Buffer	
Tris HCl, pH 7,5-8	250 mM
NaCl	500 mM

2.9.2 DNA/RNA/Protein – Isolierung aus Gewebe

Die Isolierung von DNA, RNA und Protein aus kryokonserviertem Geweben erfolgte nach einem standardisierten Protokoll, welches nach Zerkleinerung des Gewebes (Retsch Schwingmühle MM200, VWR, Darmstadt) und Aufnahme in phenolischer Lösung, die Extraktion von Nukleinsäuren (RNA und DNA) und Proteinfractionen ermöglicht.¹¹⁹

2.9.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien

Die Gesamt-RNA aus HCC-Zelllinien wurde mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II Kits isoliert, dessen Funktion auf einer Säulenaffinitätschromatographie basiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgte in 30 µl RNase-freiem H₂O, welches bei der Konzentrationsbestimmung als Referenzwert eingesetzt wurde (siehe 2.9.4).

2.9.4 Konzentrationsbestimmung von RNA

Für eine quantitative Konzentrationsbestimmung der isolierten Gesamt-RNA erfolgte eine Messung des Absorptionsspektrums, unter Verwendung des NanoDrop® ND-1000 Spektrometer. Durchgeführt wurde die Messung eines Absorptionsspektrums (230 – 400 nm). Zur Reinheitsbestimmung der RNA diente der Quotient Abs._{260nm}/Abs._{280nm}. War der Quotient ≥ 1,8, wurde die RNA für die Analysen verwendet.

2.9.5 cDNA-Synthese – Reverse Transkription

Für die Synthese von RNA in cDNA wurden 1,5 µg der Gesamt-RNA, mit 2 µl dNTPs [0,8 mM] und 1 µl eines Random-Hexamer-Primers [200 ng/µl] gemischt. Dieses Gemisch wurde für 5 Minuten auf 70°C erhitzt, damit die Sekundärstruktur der RNA denaturiert werden konnte. Anschließend wurden 4 µl des 5x Reaktionspuffers dem Mix zugefügt, für 5 Minuten bei 25°C inkubiert, um so eine Anlagerung des Primers zu ermöglichen. Nach Zugabe von 1 µl der reversen Transkriptase RevertAid™ H Minus MuLV [1 U/µl] erfolgte eine weitere 10 minütige Inkubation bei 25°C und im Anschluss die cDNA-Synthese für 1 Std. bei 42°C. Die Polymerase wurde am Ende durch Erhitzen auf 70°C für 10 Minuten inaktiviert. Die so generierte cDNA wurde sowohl für die PCR (2.9.7), als auch die semiquantitative „*realtime*“ PCR (2.9.6) verwendet.

Tabelle 6: Pipettierschema Reverse Transkription

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
1,5 µg RNA + 2 µl dNTPs + 1 µl Random Primer → 5 Minuten / 70°C	+ 4 µl Reaktionspuffer → 5 Minuten / 25°C	+ 1 µl Reverse Transkriptase → 10min / 25°C → 60min / 42°C → 10min / 70°C

2.9.6 Semiquantitative „*realtime*“ PCR

Die gezielte Analyse der Expression auf mRNA-Ebene einzelner Gene wurde, unter Verwendung der TaqMan®- PCR Technologie im ABI Prism® 7300, durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, in welchem Maße die Expression spezieller Gene durch die genspezifische RNA*interference* oder die Behandlung mit MG132 reguliert wurde. Als endogene Kontrolle (endogK) wurde die 18S-RNA gewählt, welches in der Regel keiner maßgeblichen Regulation unterliegt.¹²⁰ Die Amplifikationsrate eines PCR-Produktes kann durch die Fluoreszenzintensität, während eines PCR-Zyklus stattfindenden Abbaus von fluoreszenz-markierten Sonden bestimmt werden. Für die durchgeführten Analysen wurde zum einen ein Sonden basierendes System verwendet (SIAH-1 und SIAH-2; 18S RNA). Für den Nachweis der SIAH-1 und SIAH-2 Expression wurde ein

kommerzielles System der Firma Applied Biosystems verwendet. Für den 18S RNA Nachweis wurde den anderen Komponenten des Reaktionsansatzes eine genspezifische Sonde zugefügt. Die Sonden für die TaqMan®- Analyse sind am 5' und am 3' Ende modifiziert (siehe 2.5). Für die Analyse von FIR, FBP1, FBP2 und FBP3 wurde zum anderen die Zugabe von SYBR®Green in den Reaktionsansatz genutzt, um ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Es handelt sich dabei um einen Farbstoff, welcher nur durch Interkalation mit doppelsträngiger DNA fluoresziert. Für die Prüfung der Signalspezifität wurde im Anschluss an die ‚realtime‘-Analysen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Ein spezifisches Produkt kennzeichnet sich durch einen einzelnen, schmalen Fluoreszenzpeak aus.

Für alle verwendeten Primerpaare wurde anhand einer logarithmischen Verdünnungsreihe eine Standardkurve mit Korrelationskoeffizient erstellt. Die Steigung gab dabei Auskunft über die Effizienz der PCR-Reaktion. Zur Berechnung der Expressionswerte wurden sowohl die Angaben der Standardkurve als auch die Expressionsdaten eines Gens in Form von Dreifachwerten (Triplets) ermittelt. Als Messwert diente die Anzahl der Amplifikationszyklen, welche zum Erreichen einer definierten Fluoreszenzintensität (Schwellenwert) erforderlich waren (C_T -Wert).

Die Auswertung erfolgte durch die Berechnung der durchschnittlichen relativen Mengeneinheiten (Gen^{MW} bzw. $endogK^{MW}$ und Gen^{STABW} bzw. $endogK^{STABW}$). Dazu wurden anhand der Gleichung der entsprechenden Standardkurve die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) der C_T -Triplet-Werte errechnet. Für jede Behandlung wurde die durchschnittliche relative Mengeneinheit einer Genexpression gegen die entsprechende durchschnittliche relative Mengeneinheit der endogenen Kontrolle normalisiert. Die Berechnung und Fortpflanzung von Standardabweichungen erfolgte gemäß publizierter statistischer Verfahren.¹²¹

$$normalisierter\ Wert^{MW} Gen_T = \frac{Gen_T^{MW}}{endogK_T^{MW}}$$

$$STABW = \frac{Gen_T^{MW}}{Gen_T^{MW}} \cdot \sqrt{\left(\frac{Gen_T^{STABW}}{Gen_T^{MW}}\right)^2 + \left(\frac{endogK_T^{STABW}}{endogK_T^{MW}}\right)^2}$$

Die gewonnene normalisierte Genexpression unter definierten Versuchsbedingungen wurde anschließend in Relation zu der normalisierten Genexpression in unbehandelten Zellen (Kalibrator) gesetzt. Durch diese Rechnung erhielt man die relative mRNA-Expression eines Gens im Verhältnis zum Referenzwert der mRNA-Expression unter Kontrollbedingungen R.

$$rel. mRNAExpression_x = \left(\frac{Gen_T^{MW}}{endogK_T^{MW}} \right) \cdot \left(\frac{endogK_R^{MW}}{Gen_R^{MW}} \right)$$

$$STABW = \left(\frac{Gen_T^{MW}}{Gen_T^{MW}} \right) \cdot \left(\frac{endogK_R^{MW}}{Gen_R^{MW}} \right) \cdot \sqrt{\left(\frac{Gen_T^{STABW}}{Gen_T^{MW}} \right)^2 + \left(\frac{endogK_T^{STABW}}{endogK_T^{MW}} \right)^2}$$

Um systematische Pipettierfehler und Ungenauigkeiten durch größere Volumina zu minimieren, wurden die cDNAs für die Amplifikation der Zielgene 1:20 und für die Amplifikation der endogenen Kontrolle 1:5000 verdünnt.

Tabelle 7: Pipettierschema semiquantitative ‚realtime‘ PCR

Pipettierschema Sondensystem [20µl]		Pipettierschema SYBR®Green System [20µl]	
Mastermix (2x)	50 % [v/v]	Mastermix (2x)	50 % [v/v]
Primer 1 und 2	300 nM	Primer 1 und 2	300 nM
Sonde	200 nM	cDNA - „template“	¼ des Ansatzes
cDNA - „template“	¼ des Ansatzes		

Pipettierschema kommerzielles Sondensystem [20 µl]	
Mastermix (2x)	50 % [v/v]
Primer-Sonden-Mix (20x)	5 % [v/v]
cDNA - „template“	9/20 des Ansatzes

Tabelle 8: Temperaturprofil der ‚realtime‘ PCR und der Schmelzkurvenanalyse

qPCR Programm		} 40x	Schmelzkurvenanalyse	
Temperatur [°C]	Zeit		95°C	15 Sekunden
50	2 Minuten		60°C	30 Sekunden
95	15 Minuten		95°C	15 Sekunden
95	15 Sekunden			
60	1 Minuten			

2.9.7 PCR – Polymerasekettenreaktion

Die verwendeten PCR-Primerpaar-Sequenzen sind unter 2.5 in Tab. 4 aufgelistet.

Um die Induktion der transkriptionellen p53 Isoform in Hep3B 4Bv Zellen nachzuweisen, wurde die Expression des bekannten p53 Zielgens von p21^{WAF1} mittels PCR überprüft. Hierfür wurden 1 µl der 1:10 verdünnten cDNA als Template in die PCR eingesetzt.

PCR-Ansatz		PCR-Programm		
Template (cDNA 1:10)	1 µl	Schritt	Temperatur	Zeit
Je Primer [10 µM]	1,5 µl	1.	94°C	5 Minuten
dNTPs [10 µM]	0,5 µl	2.	94°C	30 Sekunden
Reaktionspuffer 10x	2,5 µl	3.	56°C	40 Sekunden
MgCl ₂ [25 mM]	1,5 µl	4.	72°C	35 Sekunden
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl	25 Zyklen Schritt 2. - 4.		
H ₂ O (DNase/ RNase frei)	16,3 µl	5.	72°C	10 Minuten
Σ	25 µl			
50x TAE-Puffer		5x Ladepuffer Orange G		
Tris-HCl	2 M	Glycerin (100%)	50% [v/v]	
Eisessig	0,0571% [v/v]	1 M EDTA (pH 8,0)	2% [v/v]	
EDTA (pH 8,0)	50 mM	Orange G	1% [w/v]	
1xTAE = 50x TAE 1:50 mit H ₂ O verdünnt				

20 µl des PCR-Ansatzes wurden mit Ladepuffer (1:10) versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel mittels Gel-Elektrophorese größenfraktioniert (90 V, 45 Minuten). Die anschließende digitale Dokumentation erfolgte mit dem Alphamager.

2.10 Proteinanalytik

2.10.1 Isolierung von Gesamtprotein

Für die Proteinisolierung wurde von einer ca. 80% konfluenten Zellkulturschale bzw. von Zellen nach Behandlung der Kulturüberstand vollständig entfernt und einmal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Proteinisolierungspuffer bedeckt (100 µl pro 10 cm, 70 µl pro 6 cm bzw. 50 µl pro 6-Well Platte) und für 10 Minuten auf Eis oder bei -20 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit einem „Zellschaber“ von den Kulturgefäßen abgekratzt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sofort auf Eis gestellt. Um zu gewährleisten, dass eine vollständige Lyse der Zellen stattgefunden hat, wurden die Isolate 2 x 45 Sekunden sonifiziert, wobei zwischen den Intervallen eine einminütige Eiskühlung erfolgte. Danach wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 Minuten, 4°C, 13000 rpm) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinextrakte wurden bei -20°C gelagert.

Proteinisolierungspuffer	
10x Cell Lysis Buffer (Cell Signaling)	1/10 des Ansatzes
Protease Inhibitorcocktail (Sigma)	5 % [v/v]

2.10.2 Isolierung subzellulärer Proteinfractionen

Um die subzelluläre Lokalisation von Proteinen in der Zelle zu analysieren, wurden Proteinfractionen der membranären, cytoplasmatischen und nukleären Zellkompartimente durchgeführt. Hierzu wurde das Qproteome Cell Compartment Kit der Firma QIAGEN genutzt. Die Isolierung der Fraktionen erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

In einem zweiten Verfahren erfolgte die Isolierung der cytoplasmatischen und nukleären Fraktion. Hierzu wurden Zellen einer 10 cm Schale mit ca. 80% Konfluenz trypsinisiert (siehe 2.8.1) und durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 rpm pelletiert. Die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert

(1300 rpm, 1 Minute, 4°C). Anschließend wurde das Pellet in 400 µl HB-Puffer aufgenommen, zentrifugiert (1300 rpm, 1 Minute, 4°C) und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 200 µl Lysis Puffer, wurden die Lysate für 10 Minuten auf Eis gestellt und mehrfach vorsichtig invertiert. Danach wurde das Lysat zentrifugiert (13000 rpm, 5 Minuten, 4°C). Der wässrige Überstand, welcher die cytoplasmatische Fraktion enthielt, wurde vorsichtig, ohne das Pellet zu berühren oder aufzuwirbeln, abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss wurde das Pellet mit 200 µl Lysepuffer aufgenommen, für 5 Minuten auf Eis inkubiert (mehrfach invertieren) und zentrifugiert (13000 rpm, 5 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 – 80 µl Puffer C resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert (jede Minute vortexen). Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (5 Minuten, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand (nukleäre Fraktion) vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proteinfractionen erfolgte bei -20°C.

HB – Puffer	Puffer C
10 mM Tris-HCl, pH7,3	20 mM Hepes, pH7,9
10 mM KCl	400 mM NaCl
1,5 mM MgCl ₂	1 mM EDTA
0,5 mM β-Mercaptoethanol	1 mM DTT
20 µl Proteinase Inhibitor Mix (P8340, Sigma)	20 µl Proteinase Inhibitor Mix (P8340, Sigma)

Lysis Puffer
HB - Puffer
0,4% NP-40

2.10.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die isolierten Proteinextrakte 1:10 verdünnt und mit 20% eines Coomassie-Blau-Reagent (Bradford Reagent B6916, Sigma) versetzt. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert und im Photometer (595 nm) vermessen. Anhand einer erstellten BSA- Eichgeradengleichung (5, 10, 15, 20 und 25 µg/ml) wurden die Proteinkonzentrationen der Extrakte berechnet.

2.10.4 Western Blot

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-Proteinextrakte erfolgte mittels SDS-PAGE je nach Größe des zu detektierenden Proteins in einem 10%igen oder 12%igen Polyacrylamidgel, bestehend aus Trenn- und Sammelgel (52 cm², 15 Minuten bei 50 mA und 1-2 Std. bei 100 mA). Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine, auf eine für 1 Minute mit Methanol vorbehandelte PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran mittels *Tank-Blot-System* (90 V/52 cm² für 60 Minuten) oder *Semidry-Blot-System* (1 mA/cm² für 2 Std.), transferiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation der Membran für 1 Std. in 1 x TBST mit 5 % Milchpulver oder BSA auf einem Rollschüttler. Anschließend wurde der Blockierungspuffer entfernt und der entsprechende Erstantikörper in TBST mit Milchpulver oder BSA hinzugefügt und die Membran unter ständiger Bewegung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran 3 x für je 10 Minuten mit 1 x TBST gewaschen und für 1 Std. mit dem entsprechenden Zweitantikörper auf dem Rollschüttler geschwenkt. Nach drei weiteren Waschschritten mit 1 x TBST erfolgte die Signaldetektion mit dem „ECL plus Western Blotting Detektionssystem“ oder dem „Western Lightning-Plus-ECL-Detektionssystem“ jeweils nach Angaben des Herstellers.

Die Detektion der Lichtsignale erfolgte durch Belichtung von Kodak Filmen (0,5 – 30 Minuten) und der automatischen Entwicklung durch die Entwicklermaschine (Optimax Typ TR, MS Laborgeräte, Heidelberg). Darüber hinaus erfolgte die digitale Dokumentation mit Hilfe des FluorChem-Imaging-System (Biozym), die nach Herstellerangaben genutzt wurde. Für den Nachweis der Aktin-Expression als Ladekontrolle erfolgte eine Inkubation des Erstantikörpers in TBST/5% Milchpulver für 1 Std. bei RT. Für die Signaldetektion wurde eine Signaldetektionslösung (2-minütige Inkubation bei RT) verwendet. Dafür wurden die Lösungen A und B mit einem Volumen von je 2,5 ml angesetzt, kurz vor der Exposition vereinigt und auf die Membran gegeben. Aufgrund der hohen Intensität des Aktinsignals war nur eine sehr kurze Exposition (10 – 30 Sekunden) nötig.

Polyacrylamidgel	Trenngel [10%] Proteine > 80 kDa	Trenngel [12%] Proteine < 80 kDa	Sammelgel
Acrylamid-Mix	10% [v/v]	12% [v/v]	5 % [v/v]
Tris-HCl	375 mM (pH 8,8)	375 mM (pH 8,9)	127 mM (pH 6,8)
SDS („sodium dodecyl sulfat“)	0,1% [w/v]	0,1% [w/v]	0,1% [w/v]
APS (Ammonium Persulfat)	0,1% [v/v]	0,1% [v/v]	0,1% [v/v]
TEMED	0,05% [v/v]	0,06% [v/v]	0,1% [v/v]

Laufpuffer (Gelelektrophorese)		Transferpuffer (Semidry-Blot-System)		Boratpuffer (Tank-Blot-System)	
Glycin	387 mM	Glycin	194 mM	Borsäure	450 mM
Tris-HCl	50 mM	Tris-HCl	25 mM	EDTA	20 mM
SDS	0,2 % [w/v]	Methanol	20%	mit NaOH pH 8,8 einstellen	

TBS (10x, pH 7,6)		TBST (1x)	
Tris-HCl	200 mM	TBS (10x)	10% [v/v]
NaCl	1,5 mM	Tween-20	0,1% [v/v]

Signaldetektionslösung AB			
Lösung A		Lösung B	
Tris-HCl (pH 8,0)	98,5 mM	Tris-HCl (pH 8,0)	99,4 mM
Coumarsäure	0,39 mM	H ₂ O ₂	0,018% [v/v]
Luminol	2,46 mM		

2.10.5 Densitometrische Auswertung zur semiquantitativen Analyse der Expression

Die semiquantitative Analyse der Proteinmengen eines Zielgens im Verhältnis zur Aktinkontrolle erfolgte mit dem Analyseprogramm „DensSpot“ der Alphamager Software. Um systematische Abweichungen in der Auftragsmenge zu berücksichtigen, wurde diese Analyse sowohl mit den Signalen der Zielproteine (Signalintensität_{Zielprotein}), als

auch mit den Signalen der dazugehörigen Landekontrolle (Signalintensität_{Ladekontrolle}) durchgeführt. Die relative Signalstärke des Zielproteins errechnet sich aus dem Quotienten der Zielproteinsignalstärke und der Aktinkontrollensignalstärke.

$$\text{relative Signalstärke des Zielproteins} = \frac{\text{Signalintensität}_{\text{Zielprotein}}}{\text{Signalintensität}_{\text{Ladekontrolle}}}$$

Im Anschluss wurde eine Normalisierung gegen die unbehandelte Kontrolle vorgenommen, um eine relative Aussage über die Expressionsänderung des Zielproteins nach Behandlung vorzunehmen.

$$\text{relative Änderung des Zielproteins} = \frac{\text{relative Signalstärke des Zielproteins}}{\text{relative Signalstärke der unbehandelten Kontrolle}}$$

2.10.6 Tissue-Micro-Array Analysen und Immunhistochemie

Für den Tissue-Micro-Array (TMA) wurden jeweils zwei repräsentative Areale eines Gewebes mit einem Stanzdurchmesser von 0,6 mm aus dem „Donor-Block“ in den „Akzeptor-Block“ überführt. Die analysierten TMAs beinhalteten 15 „normale“ Lebern (ohne pathologischen Phänotyp), 37 prämaligne Vorläuferläsionen (Dysplastische Knoten; DN), 161 HCCs (Grading: 34x G1, 96x G2, 24x G3 und 7x G4), 17 Zirrhosen und 27 pritumoröse Gewebeproben (ohne pathologische Veränderungen). An diesen TMAs erfolgten Immunhistochemiefärbungen für die zu untersuchenden Proteine mit den entsprechenden Antikörpern (SIAH-1, SIAH-2, FBP-3, Ki67). Repräsentative 4 µm Schnitte wurden auf ein positiv geladenen Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 42°C luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mittels Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, um danach die immunhistochemische Färbung durchzuführen. Der Epitopenaufschluss erfolgte durch Aufkochen der Paraffinschnitte (600 Watt in der Mikrowelle, 3 x 5 Minuten) in Zitratpuffer (10 mM, pH 6). Anschließend wurde die endogene Peroxidase mit 1% H₂O₂ in PBS für 30 min bei RT blockiert. Die Schnitte wurden danach mit Leitungswasser und 1x PBS gewaschen. Die Objektträger wurden nun in einer blockierenden Lösung (PBS mit 5% Milchpulver und 5% Normalserum der Spezies, in welcher der Zweitantikörper generiert wurde) für 30 Minuten bei RT, gefolgt von 2 x 15 Minuten-Inkubationen mit Avidin-Biotin-Blockierungslösungen,

behandelt (Streptavidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories, Burlingame/USA). Die Lösung wurde dann vom Objektträger entfernt, gefolgt von der Inkubation mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4°C. Die Antikörper wurden in einem Antikörperversdünnungspuffer (ChemMate Antibody Diluent, DAKO) verdünnt (siehe 2.4.). Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst mit 0,05% Triton in 1 x PBS, danach mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit einem biotinylierten Zweitantikörper (Verdünnung in 1 x PBS mit 2,5% Milchpulver; siehe 2.4) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrir mit 1 x PBS erfolgte die HRP-Konjugation des Zweitantikörpers, durch die Behandlung mit einem AB-Komplex (Vectastain ABC Standard Kit) für 30 Minuten bei RT. Die Signaldetektion wurde, nach einem weiteren Wachschrir, durch eine Inkubation mit einer Peroxidas-Substrat Lösung (1-20 Minuten, DAB-Substrat-Kit) durchgeführt. Die Farbreaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt und es erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun für 15-45 Sekunden. Die Schnitte wurden mit EUKITT eingedeckt.

Bei der Auswertung der TMAs wurden sowohl quantitative Parameter (0 – keine Färbung, 1 – Färbung in ≤ 1% aller Zellen, 2 – Färbung in 2-10% aller Zellen, 3 – Färbung in 11 bis 50% aller Zellen, 4 – Färbung in ≥50% aller Fälle) als auch qualitative Parameter (cytoplasmatische bzw. nukleäre Färbungsintensität: 0 – keine Färbung, 1 – geringe Färbung, 2 – deutliche Färbung, 3 – starke Färbung) durch unabhängige Beobachter erhoben. Anschließend wurden die erhobenen Daten mit den vorhandenen klinischen Parametern (z.B. Ätiologie, Geschlecht, Tumor-*Staging*) statistisch verglichen (Spearman Korrelationskoeffizient). Dafür wurden das Produkt aus Qualität und Quantität erhoben und im Anschluss statistisch ausgewertet.

10mM Zitratpuffer pH 6	
Zitronensäure	1,8 mM
Tri-Natrium-Zitrat	8,2 mM

2.10.7 Immunfluoreszenz

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine effektive Methode der Lichtmikroskopie zur subzellulären Lokalisierung von Proteinen. Die zu untersuchenden Zelllinien wurden auf runden Deckgläsern für 24 Std. kultiviert. Am folgenden Tag wurden diese 3 x mit 37°C warmen PBS (2 mM MgCl₂) gewaschen. Für die sich anschließende Fixierung der Zellen, wurden die Plättchen für 10 Minuten in -20°C Methanol vorbehandelt und anschließend

30 Sekunden mit gekühltem Aceton (-20°C) behandelt.

Tabelle 9: Verwendete Fluorochrome und Absorptions/Emissionsmaxima

Fluoreszenzfarbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Alexa 488	495nm	519 nm
Cy3	550 nm	570 nm
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	358 nm	461 nm

Die fixierten Zellen wurden 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden Erstantikörper in Antikörperversdünnungspuffer für 1 Std. inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit dem entsprechenden Zweitantikörper in Antikörperversdünnungspuffer inkubiert. Für eine Gegenfärbung der Zellkerne wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (1:10000 Verdünnung in Antikörperversdünnungspuffer) hinzugefügt. Bei Doppelfärbungen wurden jeweils beide verwendeten Erst- und Zweitantikörper bei der Inkubation gleichzeitig eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen 2 x 5 Minuten mit PBS, kurz mit reinst H₂O und 5 Minuten mit 100%igen Ethanol gewaschen. Die getrockneten Zellkulturplättchen wurden mit Fluoromount G eingedeckt und über Kopf auf einem Objektträger im Dunkeln bei 4°C über 3 Wochen gelagert. Die Auswertung der Fluoreszenzfärbung erfolgt anschließend am Spektralen Laser-Scanning-Konfokalmikroskop TCS SL (Leica).

2.11 Funktionelle Analysen

2.11.1 Bestimmung der Zellvitalität – „MTT-Assay“

Die Zellvitalitätsbestimmung beruht auf der Fähigkeit einer biologisch aktiven Zelle, ein Chromophor (modifiziertes Tetrazoliumsalz) mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenase zu einem blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff zu reduzieren. Die Farbintensität korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen, wodurch man in der Lage ist, Rückschlüsse auf ihre Vitalität (Lebensfähigkeit) zu erhalten. Die chemische Reduktion des Chromophors kann kolorimetrisch bestimmt werden und dient als Maß für die relative Zahl vitaler Zellen.

Für die Ermittlung der Zellvitalität, wurde einen Tag nach Inhibierung die Zellzahl bestimmt und jeweils 2000, 4000 und 6000 Zellen in 96-Well Platten ausgesät. Nach 2 – 5 Tagen (Tag 2 und 3 – 6000 Zellen; Tag 4 – 4000 Zellen; Tag 5 – 2000 Zellen) wurde das

Medium von den Zellen entfernt und 100 µl frisches 0,5 mg/µl MTT enthaltenes Medium zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für 2-4 Std. bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Nachdem Entfernen des Mediums wurden 100 µl DMSO/Ethanol (1:2) auf die Zellen gegeben und die Zellvitalität nach definierten Zeitpunkten gemessen. Die Messung des Farbumschlages erfolgte im ELISA Reader Multiscan Ascent bei 570 nm (Referenzwellenlänge 630 nm). Für die Auswertung bestimmte man die relative Zellvitalität prozentual im Vergleich zu den Kontrollzellen (Kalibrator).

2.11.2 Bestimmung der Proliferation – „BrdU-ELISA“

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden an Tag 2 nach Inhibierung die Zellen ausgezählt und 6000 Zellen auf einer 96-Well Platte ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen, in Abhängigkeit von der Konfluenz, für 2 – 4 Std. in Medium mit 10 µM BrdU inkubiert. Proliferierende Zellen sind in der Lage, anstelle des Thymidins, das Brom markierte Basenanalogen desoxy-Uracil einzubauen. Durch eine Enzym-gekoppelte Färbung der eingebauten Nukleotidanaloga und den dadurch bewirkten Farbumschlag kann die Anzahl proliferierender Zellen detektiert werden. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Messung wurde bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) im ELISA Reader Multiscan Ascent durchgeführt. Für die Auswertung der Messung wurde, wie beim MTT-Test, die relative Proliferationsrate prozentual im Vergleich zu den Kontrollzellen (Kalibrator) bestimmt.

2.11.3 Bestimmung der Apoptoserate – „FACS-Analyse“

Für die Bestimmung der Apoptoserate und der genauen Analyse des Zellzyklus wurden die behandelten Zellen mittels FACS Analytik untersucht. Für die Analysen wurden immer Triplets der einzelnen Proben verwendet.

Nach Inhibierung wurden die Zellen trypsiniert und zusammen mit dem Zellkulturüberstand zentrifugiert (10 Minuten, 800 rpm). Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen und 200 µl der Zellsuspension mit 500 µl Nicoletti-Puffer gemischt, wodurch eine Färbung mit Propidiumiodid erfolgte. Im FACS-Calibur wurden dann jeweils 10000 Zellen pro Probe hinsichtlich Granularität, Fluoreszenzintensität und Größe gemessen. Propidiumiodid ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der sich sterisch bedingt nur mit einem gewissen Basenpaarabstand in die DNA einlagert, was zu einer gesteigerten Interkalationsrate bei zunehmender DNA Degradation

führt. Daher kann die Fluoreszenzintensität nicht nur als Marker für die DNA-Menge, sondern auch für den Degradationszustand der DNA verwendet werden. Das Ausmaß der DNA-Degradation ermöglichte Rückschlüsse auf frühe, mittlere und späte Apoptose, wobei die Menge der DNA Aufschluss über die Zellzyklusphasen der Zellen gibt. Je geringer die Fluoreszenz, desto höher der Grad der DNA-Degradation und umso weiter fortgeschritten ist der Prozess der Apoptose.

Die Apoptoseanalyse erfolgte durch die logarithmische Auftragung der Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität im Acquisitionsprogramm CellQuest Pro™ (BD-Bioscience). Das Programm Modfit Lt™ (Verity Software House Inc.) diente zur Analyse des Zellzyklus, in dem das Auftragen der graphischen Darstellung linear erfolgte. In den zur Auswertung erstellten Histogrammen wurde die Größe der DNA-Fragmente (X-Achse) gegen die Anzahl der Zellen (Y-Achse) aufgetragen. Während lebende Zellen einen charakteristischen G0/G1 und G2/M Peak aufwiesen, war die fragmentierte und damit kürzere DNA der apoptotischen Zellen links neben dem Peak der G0/G1 Phase zu erkennen. In der logarithmischen Darstellung befand sich in den ersten drei Dekaden apoptotische Zellen, wobei in der dritten Dekade Zellen der frühen Apoptose, in der zweiten Dekade Zellen mittlerer Apoptose und in der ersten Dekade die Zellen der späten Apoptose, bzw. in nekrotischem Zustand, aufgetragen waren.

Nicolettipuffer	
Propidiumiodid	50 mg/ml
Natrium-Citrat	0,1% [w/v]
Triton X-100	0,1% [v/v]

2.11.4 Bestimmung der Migration - „Scratch-Assay“

Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit der Zellen nach Inhibierung mittels siRNA wurde ein Scratch-Assay durchgeführt. Bevor mit dem Assay begonnen werden konnte, wurden 16 gleichmäßige Quadrate auf den Boden eines jeden Wells mit dichtem Zellrasen einer 6-Well Platte gezeichnet. Im Anschluss wurden die Zellen wie in 2.8.4 beschrieben inhibiert. Am Tag 3 nach Inhibierung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 3 Std. mit 5 µg/ml Mitomycin C mit Antibiotika haltigem Medium ohne FCS, behandelt. Anschließend wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze 4 x pro Well der konfluenten Zellrasen zerstört (Scratch). Hierbei war darauf zu achten, dass eine möglichst gerade und gleichmäßige

Furche durch den dichten Zellteppich erzeugt wurde. Die Zellen wurden mehrfach mit FCS-freiem Medium gewaschen, bis sich der Rand der entstandenen Furche geglättet hatte und keine Wülste mehr aufwies (Abwaschen locker hängender Zellen). Nun wurden die ‚Scratches‘ mit einem Durchlichtmikroskop, unter Zuhilfenahme einer Altra 20 Olympus Kamera, dokumentiert (16 Photos/Well). Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen für 24 Std. mit dem HGF (hepatocyte growth factor, 20 ng/ml) behandelt. Am folgenden Tag wurden Zellen mit FCS-freiem Medium gewaschen und erneut 16 Photos/Well angefertigt, wobei die vorgezeichneten Quadrate eine Dokumentation der gleichen Bereiche ermöglichte. Für die Auswertung der Messung wurde die relative Migrationsfähigkeit prozentual im Vergleich zu den Kontrollzellen (Kalibrator) bestimmt.

2.11.5 Bestimmung der Klonogenität

Für die Bestimmung der Klonogenitätsfähigkeit wurden die Zellen wie in 2.8.4 beschrieben inhibiert. An Tag 1 nach Inhibierung wurden diese gezählt und 2000 Zellen (HuH-7) bzw. 6000 Zellen (Hep3B) auf 6 cm Platten ausgesät. Nach 5 Tagen Wachstum wurden die Kolonien mittels Kristallviolett-Färbung, wie in Gillies *et al.* (1986) beschrieben angefärbt.¹²² Dafür wurde das Medium von den Zellen entfernt und anschließend 1x mit PBS gewaschen, gefolgt von der Kristallviolett-Färbung (1% Kristallviolett in 50% Ethanol) für 10 Minuten. Die Kulturschalen wurden nach der Färbung unter fließendem Leitungswasser gewaschen und bei RT im Dunkeln getrocknet. Die anschließende digitale Dokumentation erfolgte mit dem Alphamager. Für die Auswertung der Messung wurde die relative Klonogenität prozentual im Vergleich zu den Kontrollzellen (Kalibrator) bestimmt.

2.12 Statistische Analysen

Die Daten wurden als Durchschnitt +/- Standardabweichung dargestellt. Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der SPSS 16.0 Software (SPSS; Chicago, USA) durchgeführt. Der Spearman-Korrelations-Koeffizient wurde als ein statistisches Maß für die Auswertung der TMA-Array-Daten verwendet. Der Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney U Test durchgeführt. Der U-Test ist ein Homogenitätstest und dient der Überprüfung der Signifikanzen von Übereinstimmungen zweier Verteilungen. Die Signifikanzlevel wurden wie folgt definiert: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, und *** $p < 0.001$.

3. Ergebnisse

Im Rahmen von Expression-Profiling-Analysen von primären humanen HCCs wurde die differentielle Regulation von Genen mit maßgeblichem Einfluss auf die Tumorprogression identifiziert. Zu diesen gehören u.a. Wachstumsfaktoren (z.B. *insulin like growth factor* (IGF-II)¹²³) und Mikrotubulus-destabilisierende Faktoren (Stathmin (STMN1)¹²⁴). Auch Bestandteile des Ubiquitin-Proteasom-Systems wurden im Rahmen der cDNA-Micro-Arrays in ihrer Expression dysreguliert nachgewiesen. So konnte eine deutliche Reduktion der Expression von SIAH-1 in 30% der untersuchten HCCs beobachtet werden.⁵²

3.1 Expression von SIAH-1 und SIAH-2 in der Hepatokarzinogenese

Um die Expression der SIAH Familienmitglieder im HCC Gewebe auf Transkriptebeine zu analysieren, wurden genspezifische semiquantitative „*real-time*“ PCR-Analysen für SIAH-1 und SIAH-2 an einem Kollektiv von HCCs (n = 70) im Vergleich zu normalem Lebergewebe (n = 3) durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigten für SIAH-1 die cDNA-Micro-Array Daten und zeigten eine Reduktion um den Faktor ≥ 2 in 33% (23/70) der untersuchten HCCs, während in 67% (47/70) keine Regulation zu verzeichnen war (Abb. 4A).

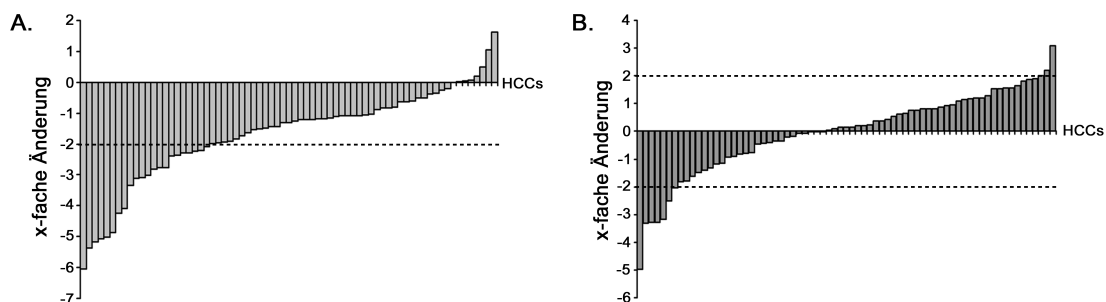


Abbildung 4: Relative Transkriptmengen von SIAH-1 und SIAH-2 in primären humanen HCCs.

Unter Verwendung einer semiquantitativen „*real-time*“ PCR-Analyse wurde die Transkriptmenge der Ubiquitin-Ligasen SIAH-1 und SIAH-2 analysiert. Die horizontalen Linien repräsentieren die 2-fache Änderung im Vergleich zu normalen Lebern (Mittelwert aus Proben von 3 gesunden Lebern).

Im Gegensatz dazu, konnte für SIAH-2 lediglich eine Regulation in 13% (hochreguliert: 3%; runterreguliert: 10%), auf mRNA-Ebene um mind. den Faktor 2, nachgewiesen werden. In 87% (61/70) der analysierten HCCs war keine Änderung der Expression im Vergleich zu normalen Lebern zu detektieren (Abb. 4B).

Für die nähere Untersuchung der Expression und der subzellulären Verteilung von SIAH-1 und SIAH-2 im Verlauf der humanen Hepatokarzinogenese, wurden Micro-Tissue-Arrays,

welche Gewebeprobe von gesunden Lebergeweben, prämalige Vorläuferläsionen (Dysplastische Knoten, DN) und HCCs mit unterschiedlichen Entdifferenzierungsgraden beinhaltet, immunhistochemisch analysiert.

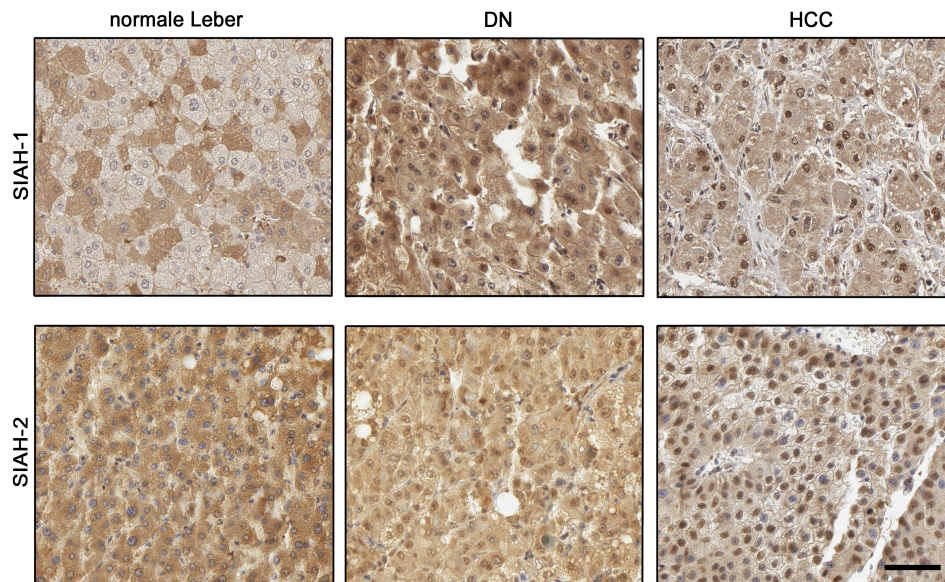


Abbildung 5: Expression von SIAH-1 und SIAH-2 in Leber- und Tumorgewebe

Tissue-Micro-Array Analysen von SIAH-1 und SIAH-2 zeigten eine exklusive zyttoplasmatische Lokalisation in der normalen Leber. Mit dem Grad der Entdifferenzierung ist eine signifikante nukleäre Akkumulation beider Ligasen zu beobachten. Skala: 100 µm

Beide Ligasen zeigten eine exklusive zyttoplasmatische Lokalisation in gesundem Lebergewebe. Während für SIAH-2 eine homogene zyttoplasmatische Färbung in Parenchymzellen beobachtet werden konnte, zeigte SIAH-1 im normalen Lebergewebe eine ungleichmäßige Färbung (Abb. 5). Insbesondere für SIAH-1 konnte eine Tendenz zur Expression in periportal-lokalisierten Hepatozyten entlang der Leberlappengrenzen festgestellt werden (Abb. 6A).

Besonders häufig war die nukleäre Akkumulation in Tumorzellen zu beobachten, welche entlang von Stromasepten angeordnet waren (Abb. 6B). Im Verlauf der Hepatokarzinogenese, d.h. vom gesunden Lebergewebe, über DNs zu HCCs, konnte eine Zunahme der nukleären Akkumulation von SIAH-1 und SIAH-2 verzeichnet werden (SIAH-1 - Abb. 6C; SIAH-2 – Abb. 6D). In der normalen Leber war keine Kernfärbung für SIAH-1 und SIAH-2 nachweisbar. In den DNs war eine Akkumulation von SIAH-1 in 8%, wohingegen in den untersuchten HCCs eine 31%ige nukleäre Akkumulation von SIAH-1 detektiert werden konnte. Für SIAH-2 ist dieses Phänomen ebenfalls zu beobachten, hier zeigten 50% der

DNs eine starke nukleäre Akkumulation und 62% der analysierten HCCs wiesen eine SIAH-2 Akkumulation auf.

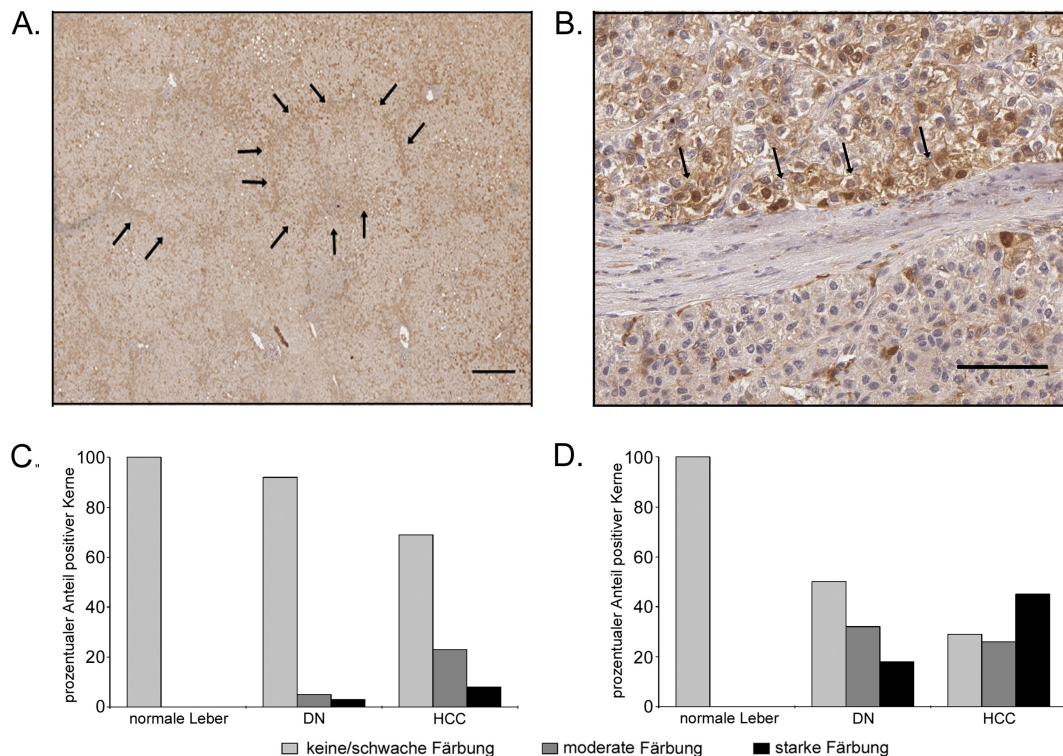


Abbildung 6: SIAH-1 und SIAH-2 Expression im HCC

Tissue-Micro-Array Analysen von SIAH-1 und SIAH-2 zeigten eine zytoplasmatische Expression von SIAH-1 in den Hepatozyten entlang der Leberlappen (A; Skala: 400 µm; Pfeile: SIAH-Färbung an der Leberlappenbegrenzung), sowie eine Stroma-assoziierte nukleäre Akkumulation von SIAH-1 und SIAH-2 in HCCs (B; Skala: 100 µm; Pfeile: SIAH-Färbung entlang der Stromasepten). Die Darstellung der Verteilung von nukleärer Expression der Ligasen SIAH-1 (C) und SIAH-2 (D) in den analysierten Geweben, verdeutlicht die zunehmende Anreicherung im Zellkern mit dem Prozess der malignen Transformation.

Die statistische Analyse der zytoplasmatischen SIAH-1 Färbung in Leber, DN und HCC verdeutlichte eine verringerte zytoplasmatische Expression von SIAH-1 in den Tumorgeweben im Vergleich zu normalen Lebern (Abb. 7). Ein weitere statistisch signifikante Abnahme der zytoplasmatischen SIAH-1 Expression vom DN zum HCC konnte nicht beobachtet werden. Dem gegenüber konnte eine statistische signifikante Zunahme der nukleären Färbung für SIAH-1 und SIAH-2 in den prämaligen DNs (SIAH-1: 8%, SIAH-2: 50%) und in den Karzinomen (SIAH-1: 31%, SIAH-2: 62%) detektiert werden. Die nukleäre Akkumulation von SIAH-1 und SIAH-2 korrelierte in der Gruppe der HCCs

moderat und invers miteinander ($r = -0,222$, $p = 0,006$).

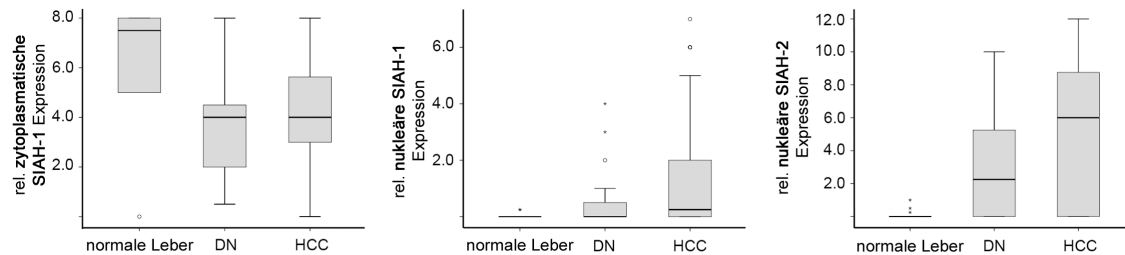


Abbildung 7: Boxplot Darstellung der Micro-Tissue-Array-Daten

Graphische Darstellung der zytoplasmatischen und nukleären SIAH-1 und SIAH-2 Färbung (qualitativer x quantitativer Parameter) in normalen Lebern, DN und HCCs. Der Boxplot ist ein Diagramm, welches für die graphische Darstellung einer Reihe numerischer Daten verwendet wird. Alle Werte, also der Median (Zentralwert), die zwei Quartile und die beiden Extremwerte, sind dargestellt. In der Darstellung gibt es einzeln dargestellte Punkte, welche die Ausreißer darstellen.

In der Gruppe der normalen Lebern, DN und HCCs konnte eine moderate signifikante Korrelation zwischen nukleärer Akkumulation von SIAH-1 und SIAH-2 mit dem Grad der Entdifferenzierung verzeichnet werden (SIAH-1: $r = 0,179$, $p = 0,008$; SIAH-2: $r = 0,375$, $p < 0,0001$). In der Gruppe der HCCs war für SIAH-2 darüber hinaus eine positive Korrelation der nukleären Expression mit der Tumorzell-Proliferation zu beobachten (Ki67 Färbung; $r = 0,346$, $p < 0,001$; Abb. 8).

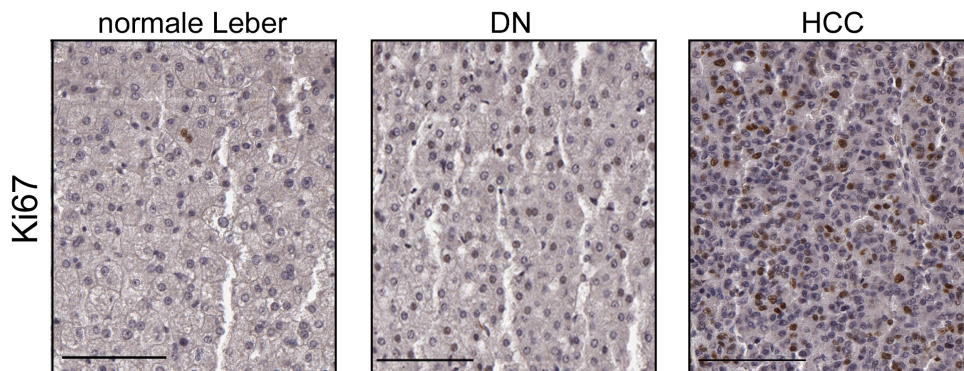


Abbildung 8: Expression von Ki67 in Leber- und Tumorgewebe

Tissue-Micro-Array Analysen von Ki67 zeigten eine positive Korrelation in der Gruppe der HCCs mit der nukleären Expression von SIAH-2. Skala: 100 μm

Es konnte keine Korrelation der SIAH-1 und SIAH-2 Expression mit der Tumor-Ätiologie (z.B. HBV/HCV Infektion) oder anderen Parameter (z.B. Geschlecht, Alter, Tumor-Staging) nachgewiesen werden. Diese Daten belegen, dass SIAH-1 und SIAH-2 auf Transkriptebe-

unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Für beide Ubiquitin-Ligasen konnte jedoch während des Prozesses der Hepatokarzinogenese eine verstärkte Lokalisation im Zellkern von Tumorzellen detektieren werden.

3.2 Subzelluläre Lokalisation und Expression von SIAH-1 und SIAH-2 in HCC-Zelllinien

Die initialen Daten verdeutlichten, dass neben der reduzierten Expression von SIAH-1, eine nukleäre Expression für beide Ligasen in humanen HCC-Geweben vorlag. Diese Resultate legten den Schluss nahe, dass die nukleäre Translokation von SIAH-1 und SIAH-2 ein wichtiges Ereignis für die Tumorzelle darstellt. Aus diesem Grund wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation beider Ligasen in den entsprechenden *in vitro* Modellsystemen (HCC-Zelllinien) analysiert.

3.2.1 Untersuchung der Expression und Lokalisation von SIAH-1 und SIAH-2 in HCC-Zelllinien

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von SIAH-1 und SIAH-2 in den verschiedenen Lebertumor-Zelllinien (HuH-7, HepG2 und Hep3B), wurden zytoplasmatische und nukleäre Proteinfraktion von konfluenten Zellkulturen präpariert.

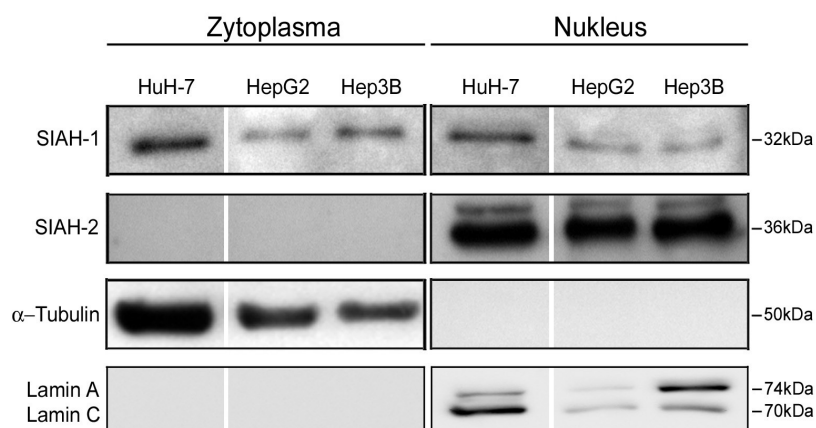


Abbildung 9: Nukleäre Lokalisation von SIAH-1 und SIAH-2 in HCC-Zelllinien

Die Proteinfraktionierung bestätigte die Kernlokalisation von SIAH-1 und SIAH-2 in den untersuchten Zelllinien (HuH-7, HepG2 und Hep3B). Für SIAH-1 konnte daneben auch eine zytoplasmatische Expression beobachtet werden. Als Marker für die Qualität der Fraktionierung dienten α-Tubulin (Zytoplasma) und Lamin A/C (Nukleus).

Die Fraktionierung und die sich anschließenden Western-Blot Analysen verdeutlichten

eine deutliche nukleäre Expression von SIAH-1 und SIAH-2 in allen untersuchten Zelllinien. Für SIAH-1 konnte neben der Expression in der Kernfraktion auch eine zytoplasmatische Lokalisation belegt werden (Abb. 9). Um die Qualität der Aufreinigung zu überprüfen und somit Kontaminationen durch Präparationsfehler auszuschließen, wurden die Proben auf die Expression von Zellkompartiment-spezifische Proteinen hin untersucht. Als Marker für die zytoplasmatische Fraktion diente α -Tubulin, ein Hauptbestandteil des Mikrotubulusskeletts. Zur Kontrolle der Kernfraktion wurde Lamin, ein Intermediärfilament welches mit membrangebundenen Proteinen an der inneren Kernmembran verankert ist, verwendet. Für alle Fraktionierungen konnten keine detektierbaren Kontamination durch Proteine anderen Fraktionen festgestellt werden.

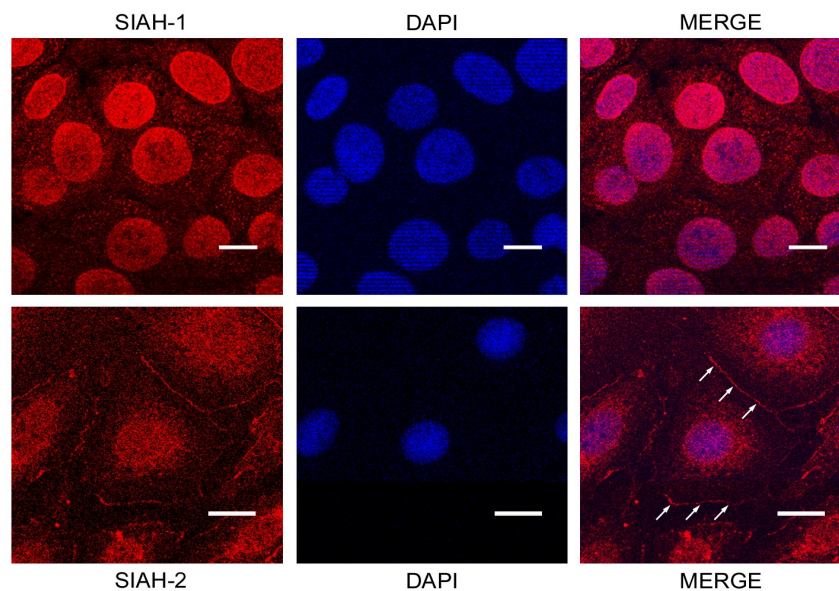


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbungen von SIAH-1 und SIAH-2 in HCC-Zelllinien

Immunfluoreszenzfärbungen für SIAH-1 und SIAH-2 in HCC-Zelllinien (darstellt sind HuH-7 Zellen) verifizierten die prominente nukleäre Lokalisation und zeigten für SIAH-2 eine deutliche membranassoziierte Färbung. Reihenfolge der Darstellungen: 1. spezifischen SIAH-Färbung; 2. spezifische Kernfärbung (DAPI); 3. MERGE beider Einzelbilder. Skala: 20 μ m; Pfeile: Markierung Membranfärbung

Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Tag 3 nach Aussäen der Zellen, bestätigten die prominente nukleäre Lokalisation der beiden Ubiquitin-Ligasen (Abb. 10). Für SIAH-2 zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Analysen ebenfalls eine schwache, aber reproduzierbare submembranäre Lokalisation (Pfeile Abb. 10). Da bisher kaum Daten bezüglich der membranären Lokalisation für SIAH Moleküle beschrieben waren, wurden

weiterführende Untersuchungen mit zytoplasmatischen, nukleären und membranären Proteinfractionen durchgeführt (Abb. 11). Die zusätzliche Fraktionierung der membranären Proteine konnte auch in der Western Blot Analyse die Membran-assoziierte Lokalisation von SIAH-2 in der Immunfluoreszenzanalyse bestätigen. Um die Reinheit der einzelnen Proteinfractionen zu verifizieren, wurden Analysen mit bekannten Faktoren der einzelnen Zellkompartimente durchgeführt (Zytoplasma: α -Tubulin; Membran: E-Cadherin; Nukleus: Ki67). Die Western Blot Analysen belegten, dass in den einzelnen Fractionen keine Kontaminationen mit anderen Fraktionierungsbestandteilen nachzuweisen war, so dass das membranäre Signal für SIAH-2 wahrscheinlich auf eine spezifische Interaktion der Ligase mit Membrankomponenten zurückzuführen war.

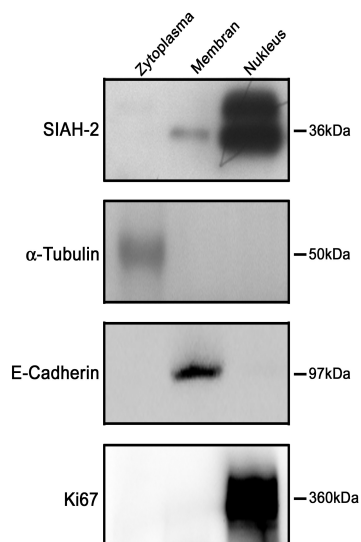


Abbildung 11: Bestätigung der membran-assoziierten Lokalisation von SIAH-2

Western Blot Analysen (jeweils 40 μ g Protein/Spur) der SIAH-2 Expression in den verschiedenen Zellkompartimenten (dargestellt sind HuH-7 Zellen). Für SIAH-2 konnte neben der Expression in der Kernfraction auch eine leichte membranäre Expression nachgewiesen werden. Ki67 (Kern), E-Cadherin (Membran) und α -Tubulin (Zytoplasma) dienen als Kontrollen für die Reinheit der Proteinfractionen.

Im Zuge der Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von SIAH-1 und SIAH-2 mittels Immunfluoreszenz, wurden auch Doppelfärbungen mit α -Tubulin, einem beschriebenen Interaktionspartner der SIAH-Proteine, durchgeführt.¹²⁵ Die Ergebnisse verdeutlichten, dass sowohl SIAH-1 als auch SIAH-2 während der Ana- und Telophase des Mitoseprozesses mit den Mikrotubulusfilamenten der Teilungsspindel kolokalisieren (Abb. 12). Die Intensität der SIAH Färbung nahm zu den Spindelpolen hin noch zu. Dies verdeutlicht, dass die nukleäre Lokalisation beider SIAH-Familienmitglieder auch in den verwendeten HCC-Zelllinien nachweisbar war. Insbesondere aufgrund der beobachteten nukleären Akkumulation beider Ligasen, stellten diese Zelllinien geeignete Modellsysteme für die weiterführenden Untersuchungen zur Funktion von SIAH-1 und SIAH-2 in HCC Zellen dar.

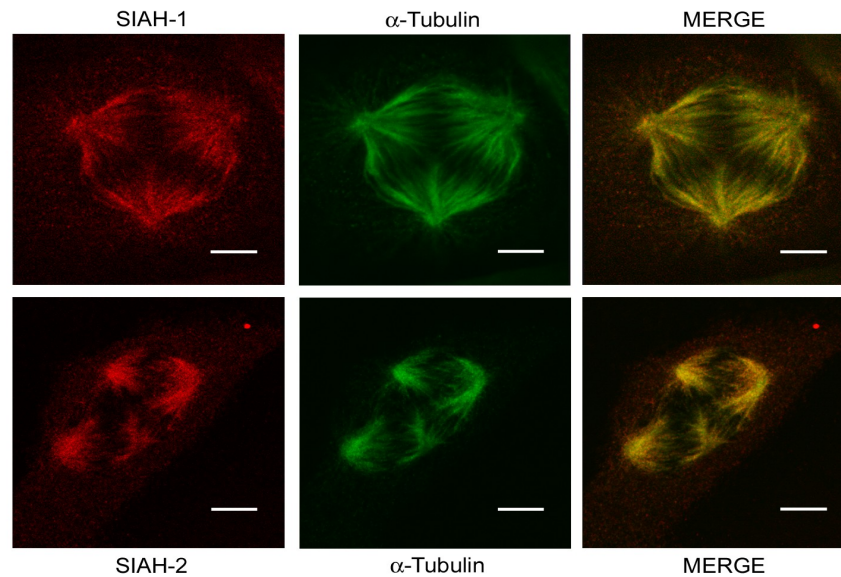


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Doppelfärbung von SIAH-1/-2 und α -Tubulin

Die Untersuchung belegte die Kolo-kalisation von beiden SIAH Familienmitgliedern mit dem Mikrotubulusapparat während der chromosomalen Segregation in der Mitose. Für SIAH-1 ist beispielhaft eine häufig zu beobachtende tripolare Spindel dargestellt. Für SIAH-2 werden zwei nebeneinander liegende Mitosen gezeigt. Dargestellt wurden beispielhaft HuH-7 Zellen.

Die in den TMAs identifizierte inverse Korrelation der Expression von SIAH-1 und SIAH-2 verdeutlichte, dass beide Proteine unabhängigen Regulationsmechanismen unterliegen. Darüber hinaus belegten die immunfluoreszenzmikroskopischen Daten aber auch, dass beide Ligasen in räumlicher Nähe zur Mitosespindel während der chromosomalen Segregation lokalisiert vorliegen. Um die mögliche differenzielle Expression von SIAH-1 und SIAH-2 im Rahmen der Mitose zu untersuchen, wurde die Expression beider Ligasen nach der Synchronisation des Zellzyklus analysiert (Abb. 13). Für SIAH-1 konnte ein über den Beobachtungszeitraum (Tag 1-7) stetig ansteigendes Expressionsniveau beobachtet werden. Für SIAH-2 zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Proteinmenge von Tag 1 bis Tag 3. Anschließend wurde ein Rückgang der SIAH-2 Expression detektiert, welcher erst ab Tag 6 der Untersuchung wieder leicht Anstieg.

Diese Ergebnisse belegen erneut, dass für beide Ligasen unterschiedliche Regulationsmechanismen existieren müssen, welche den abweichenden Expressionsprofilen nach Synchronisation des Zellwachstums zugrundeliegen.

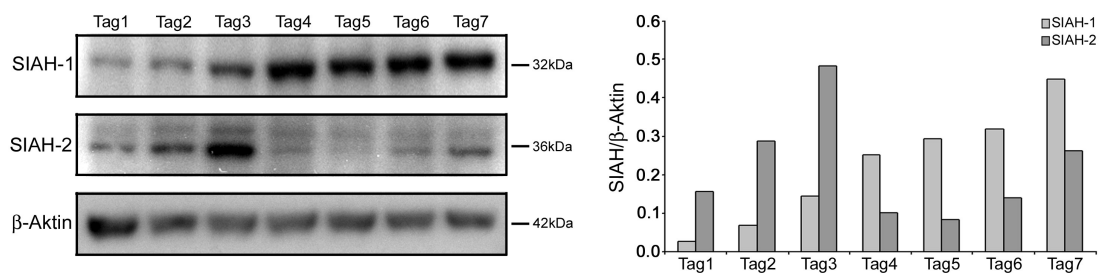


Abbildung 13: Untersuchung der Expression von SIAH-1 und SIAH-2 nach Zellzyklussynchronisation

Western Blot Analysen der Expression von SIAH-1 und SIAH-2 an 7 aufeinander folgenden Tagen, nach Synchronisation des Zellwachstums (dargestellt sind HuH-7 Zellen). Die densitometrische Auswertung und Normalisierung gegen die Ladekontrolle Aktin verdeutlicht die Konzentrationszunahme von SIAH-1 im Verlauf des Experiments und die alterierende Expression von SIAH-2 (Max: Tag 3).

3.3 Optimierung des siRNA Transfektionsprozesses

Die bisherigen Ergebnisse zeigten neben einer unterschiedlichen Regulation von SIAH-1 und SIAH-2 im Rahmen des Zellzyklus, auch eine präferentiell nukleäre Akkumulation in HCC Zelllinien. Dies legt den Schluss nahe, dass die Kernlokalisation der SIAH-Proteine unabhängig voneinander für die Hepatokarzinogenese von besonderer Bedeutung zu sein scheint. Aus diesem Grund wurde in den weiterführenden Untersuchungen eine Reduktion von SIAH-1 und SIAH-2 mittels transienter Transfektion von genspezifischer *small interfering RNA* (siRNA) vorgenommen. Die *RNAinterference* (RNAi) ist ein Prozess, bei dem eine genspezifische doppelsträngige RNA (dsRNA), ggf. nach der Prozessierung, am 5'-Ende phosphoryliert und in den ‚*RNAi induced silencing complex*‘ (RISC) durch ATP-abhängige RNA-Helicase Aktivität eingebaut wird und die Synthese eines Genproduktes durch die Degradation der mRNA verhindert.¹²⁶ Um eine möglichst hohe Effizienz der *RNAinterference* zu erzielen, wurden im Vorfeld verschiedene experimentelle Parameter und ihr Einfluss auf die relative SIAH Expression untersucht.

siRNAs

Entsprechend der Kriterien für die Erstellung effizienter siRNAs, wurden für SIAH-1 und SIAH-2 jeweils 3 siRNAs designed, chemisch synthetisiert und transient in HCC Zelllinien transfiziert (siehe 2.5). Als Kontrollen dienten sowohl unbehandelte Zellen als auch nonsense siRNA. Die Untersuchungen der siRNA-Effizienz wurde unabhängig sowohl für HuH-7 als auch für Hep3B Zellen durchgeführt.

Initial wurde für die transiente Transfektion der verschiedenen siRNAs jeweils eine Endkonzentration von 100 nM eingesetzt. Zur Überprüfung der Inhibierungseffizienz erfolgten Western Blot Analysen (Abb. 14). Für SIAH-1 zeigten die siRNA #1 und #3, sowohl in HuH-7 (bis zu 85% nach densitometrischer Quantifizierung und Abgleich gegen das „house-keeping“ Gen β -Aktin; Abb. 14B oben) als auch in Hep3B Zellen (bis zu 90%; Abb. 14A oben) die größten Inhibierungseffizienzen. Die siRNA #2 zeigt im Vergleich zur nonsense siRNA und den unbehandelten Zellen nur eine geringe Effizienz (bis zu 17%). Die getesteten SIAH-2 siRNAs zeigten kein gleichmäßiges Bild in den verwendeten Zelllinien. Hier waren in HuH-7 Zellen (Abb. 14B unten) die siRNAs #1 und #3 am effektivsten (bis zu 76%). In Hep3B Zellen (Abb. 14A unten) zeigten die siRNAs #1 und #2 die deutlichste Inhibierungseffizienz im Vergleich zu den Kontrollen (bis zu 65%).

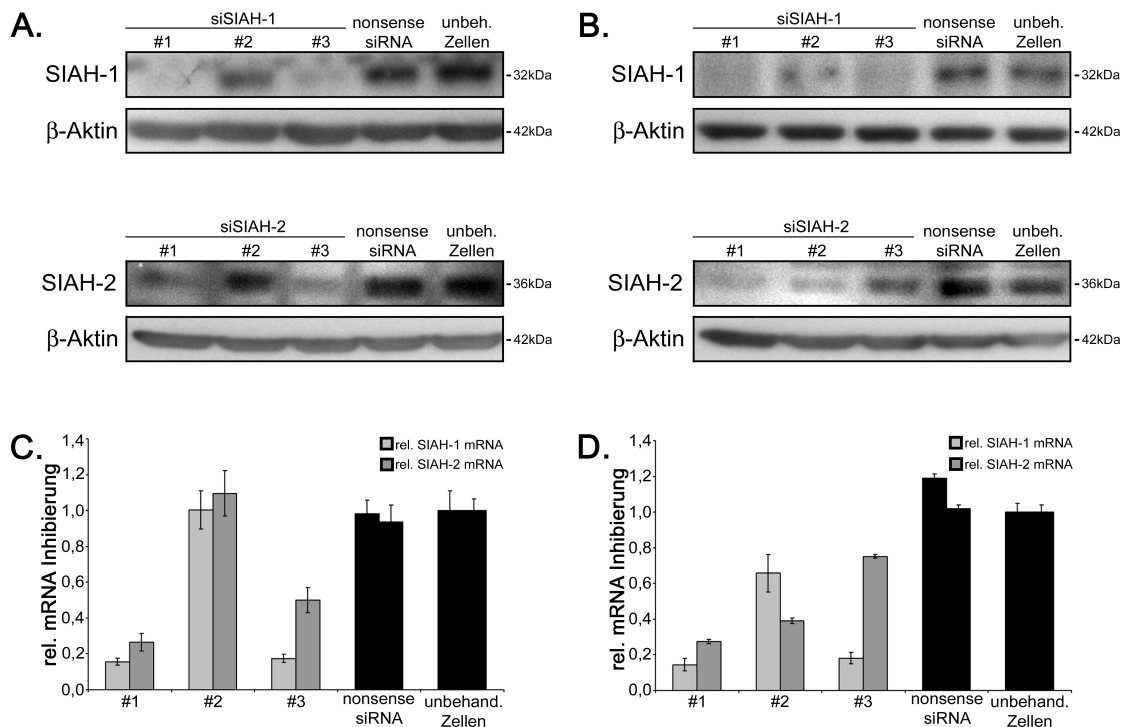


Abbildung 14: Austestung der Inhibierungseffizienz von siRNA zur spezifischen Reduktion von SIAH-1 und SIAH-2

Es wurden jeweils 3 verschiedene siRNAs im Vergleich zu nonsense siRNA transfizierten Zellen und unbehandelten Zellen getestet. Die Zellen wurden an Tag3 nach Inhibierung analysiert. (A) Darstellung der Western Blot-Analysen der siRNA-Inhibierungen von SIAH-1 und SIAH-2 in Hep3B Zellen. (B) Western-Blot-Untersuchung der Inhibierungseffizienz in HuH-7 Zellen. (C) semiquantitativen „real-time“ PCR-Analysen in Hep3B-Zellen. (D) Darstellung der semiquantitativen „real-time“ PCR-Analysen in HuH-7-Zellen. (schwarze Balken: nonsense siRNA behandelte und unbehandelte Zellen)

Diese Ergebnisse konnten auch auf mRNA-Ebene mittels semiquantitativer *“real-time”* PCR-Analyse bestätigt werden. Die Untersuchung der Inhibierungseffizienz zeigte, dass die transiente Transfektion der Zellen mit der SIAH-1 und SIAH-2 spezifischen siRNA zu einer Reduktion der mRNA-Expression in den Hep3B Zellen um bis zu 84% (SIAH-1) bzw. 73% (SIAH-2) führte (Abb. 14C). In HuH-7 Zellen konnte eine maximale Reduktion von 86% für die SIAH-1 siRNA #1 und 72% für die SIAH-2 siRNA #1 erreicht werden (Abb. 14D). Für die im Folgenden beschriebenen Optimierungsschritte wurde für beide Ubiquitin-Ligasen jeweils die siRNA #1 herangezogen, da mit dieser die deutlichste Reduktion von SIAH-1 und SIAH-2 auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnten.

siRNA Konzentration

Es ist bekannt, dass Transfektionen hoher Konzentrationen einer siRNA zu unspezifischen molekularen und biologischen Effekten in Zellen führen können.¹²⁷ Daher wurden Hep3B und HuH-7 Zellen mit unterschiedlichen siRNA Konzentrationen (5 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM und 100 nM) transient transfiziert und die Inhibierungseffizienz unter diesen Bedingungen getestet, um die geringste siRNA Konzentration zu bestimmen, bei der noch eine effiziente Inhibierung des Zielgens zu beobachten ist.

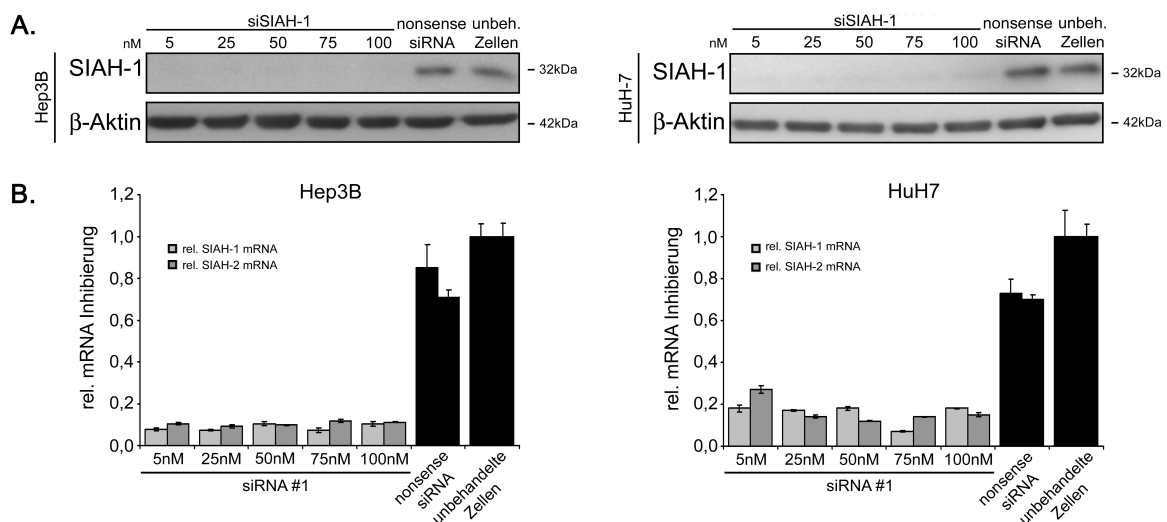


Abbildung 15: Einfluss der Menge SIAH-spezifischer siRNA auf die Inhibierungseffizienz

Die Proteinmenge von SIAH-1, 72 Stunden nach der transienten Transfektion von 5 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM und 100 nM doppelsträngiger siRNA in Hep3B und HuH-7 Zellen. Schon eine Konzentration von 5 nM genspezifischer siRNA führte zu einer effektiven Reduktion des Zielgens. Als Kontrollen dienten nonsense siRNA behandelte und unbehandelte Zellen.

Die Untersuchungen erfolgten beispielhaft mit der SIAH-1 siRNA #1, welche bei hohen

Konzentrationen die effizientesten Inhibierungseffekte hatte. Die Daten der Western Blot Analyse (Abb. 15A) zeigten, dass auch die niedrigsten verwendeten Konzentrationen der siRNA zu einer effizienten Reduktion des SIAH-1 Expression führte. Dies Ergebnisse ließen sich für beide SIAH-Ligasen auf mRNA-Ebene bestätigen, auch hier zeigte die niedrigste siRNA-Konzentration eine effiziente Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 (Abb. 15B). Da durch den Einsatz dieser geringeren siRNA-Konzentrationen ebenfalls optimale Inhibierungseffizienzen erzielt werden konnten, wurden alle folgenden Experimente mit einer Endkonzentration von 5 nM siRNA durchgeführt.

3.4 Reduktion der SIAH-1 und SIAH-2 Expression durch genspezifische siRNA Transfektion in HCC-Zellen

Entsprechend des etablierten Protokolls wurden Hep3B wie auch HuH-7 Zellen mit gegen SIAH-1 und SIAH-2 gerichteten siRNAs transient transfiziert. Um ggf. existierende redundante biologische Effekte beider Ligasen identifizieren zu können, wurde neben den Einzel- auch Doppelinhibierung für SIAH-1 und SIAH-2 etabliert. Hierfür wurden beide siRNAs in der etablierten Konzentration gleichzeitig transfiziert (Endkonzentration: 10 nM). Die an Tag 3 nach Transfektion isolierte mRNA wurde in einer semiquantitativen *“real-time”* PCR auf die Expression des jeweiligen Zielgens hin untersucht (Hep3B: Abb. 16A; HuH-7: Abb. 16B).

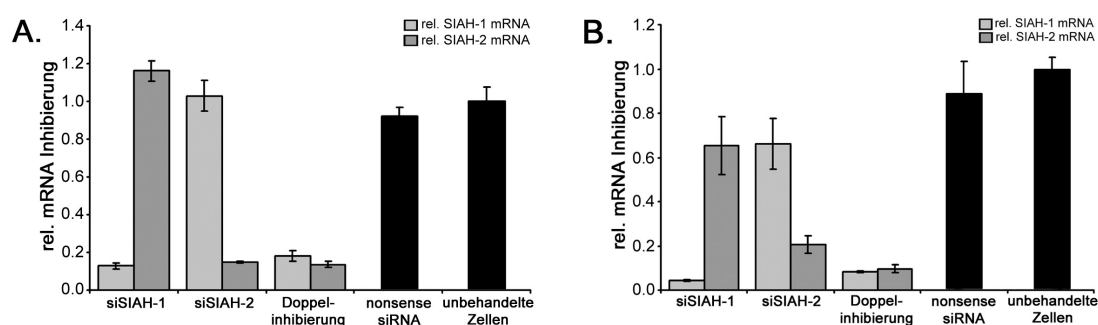


Abbildung 16: Relative SIAH-1 und SIAH-2 Transkriptmenge nach siRNA Transfektion

Drei Tage nach Transfektion SIAH-1-spezifischer und SIAH-2-spezifischer siRNA wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels semiquantitativer *“real-time”* PCR die relative Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle = Kalibrator) in Hep3B Zellen (A) und HuH-7 Zellen (B) bestimmt. (Inhibierung SIAH-1: hellgraue Balken; Inhibierungen SIAH-2: dunkelgraue Balken; Kontrollen: schwarze Balken)

Die Analyse zeigte, dass die Behandlung der Zellen mit der siRNA #1 gegen SIAH-1 und

SIAH-2 zu einer Reduktion der mRNA-Expression in den Hep3B Zellen um 87% (SIAH-1) bzw. 85% (SIAH-2) führte. Bei der kombinierten Behandlung mit beiden siRNAs konnte eine Inhibierung von 82% (SIAH-1) bzw. 86% (SIAH-2) erzielt werden (Abb. 16A). In HuH-7 Zellen wurde bei den Einzelinhibierungen eine Reduktion von 95% für die SIAH-1 siRNA und 79% für die SIAH-2 siRNA erreicht. In der Doppelinhibierung zeigte sich eine Verminderung der Expression von 90-92% auf Transkriptebene (Abb. 16B). Im Rahmen der mRNA Expressionsanalyse wurden auch die mRNA-Isolate der mit SIAH-1 siRNA transfizierten Zellen auf die SIAH-2 mRNA Konzentration und die SIAH-2 siRNA transfizierten Zellen auf die SIAH-1 mRNA Konzentration hin untersucht, um eine eventuelle Unspezifität aufgrund des hohen Homologiegrades beider Ligasen auf Nukleinsäureebene ausschließen zu können. In Hep3B und in HuH-7 Zellen konnten nur nicht signifikante Effekte auf das jeweils andere SIAH-Familienmitglied detektiert werden. Für alle durchgeführten Inhibierungen wurde durch die Transfektion mit der nonsense siRNA kein Einfluss auf die SIAH-1 und SIAH-2 mRNA Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nachgewiesen.

Um die Effekte der Inhibierung auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurde drei Tage nach der genspezifischen siRNA Transfektion Gesamtproteinfraktionen isoliert und mittels Western Blot Analytik analysiert. Auch bei der Proteinanalyse wurden die jeweiligen Lysate nach SIAH-1 und SIAH-2 Inhibierung mit dem Antikörper des anderen SIAH-Familienmitglieds untersucht, um unspezifische Kreuzreaktionen auszuschließen.

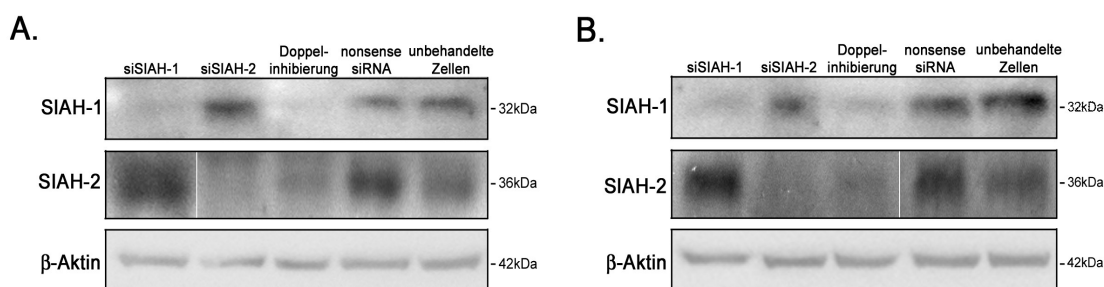


Abbildung 17: SIAH-1 und SIAH-2 Proteinreduktion nach genspezifischer siRNA Transfektion

Gesamtproteinextrakte von Hep3B Zellen (A) und HuH-7 Zellen (B) nach Transfektion mit SIAH-1-spezifischer siRNA oder mit SIAH-2-spezifischer siRNA wurden sowohl auf die Expression von SIAH-1 als auch von SIAH-2 hin untersucht. Des Weiteren wurden Doppelinhibierungen für SIAH-1 und SIAH-2 durchgeführt. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit nonsense siRNA transfiziert oder unter normalen Standardbedingungen kultiviert wurden.

Wie sich schon auf mRNA Ebene zeigte (Abb. 16) erzielte die SIAH-1-spezifische siRNA

eine nahezu vollständige Reduktion von SIAH-1 auf Proteinebene sowohl in Hep3B Zellen (Abb. 17A) wie auch in HuH-7 Zellen (Abb. 17B). Die effiziente Inhibierung von SIAH-1 von bis zu 80% konnte sowohl in der Einzel- als auch in der Doppelinhibierung beobachtet werden.

Auch die Daten der TaqMan Analyse für SIAH-2 konnten auf Proteinebene bestätigt werden. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion von SIAH-2 nach transients Transfektion der spezifischen siRNA in den Einzelinhibierung, wie auch in der Doppelinhibierung mit der SIAH-2 spezifischen siRNA (bis zu 90% Reduktion). Die Transfektion der nonsense siRNA beeinflusste die SIAH-1 und/oder SIAH-2 Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen nicht.

3.4.1 Reduktion der Zellvitalität nach SIAH-1 und SIAH-2 Inhibierung in HCC-Zellen

Nach Etablierung der genspezifischen Reduktion von SIAH-1 und SIAH-2 wurden funktionelle Untersuchungen nach Reduktion der Ubiquitin-Ligasen durchgeführt. Zunächst wurden die Auswirkungen der genspezifischen siRNA Transfektionen auf die Zellvitalität sowohl in Hep3B (Abb. 18A) wie auch in den HuH-7 Zellen (Abb. 18B) mittels MTT-Tests (2.11.1) untersucht. Die Zellen wurden wie in 2.8.4 beschrieben transient transfiziert, in definierter Zelldichte ausgesät und in 5 aufeinander folgenden Tagen analysiert.

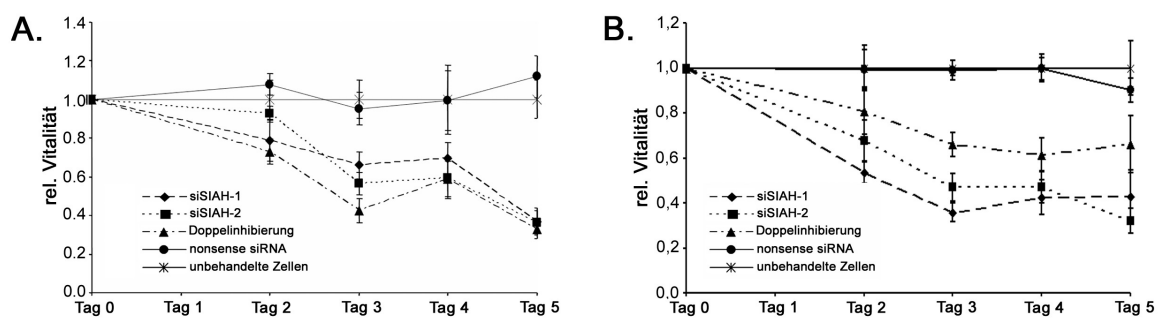


Abbildung 18: Einfluss der SIAH-Reduktion auf die Zellvitalität

Hep3B (A) und HuH-7 (B) Zellen wurden nach dem Standardprotokoll mit den entsprechenden siRNAs transfiziert und für weitere 5 Tage kultiviert. Es wurden sowohl Einzel- wie auch Doppelinhibierungen analysiert. An jedem Tag wurde die Messung der Zellvitalität durchgeführt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 8 unabhängige Messwerten mit der entsprechenden Standardabweichung.

Die Transfektion von nonsense siRNA zeigte keine Effekte in den untersuchten Zelllinien.

Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und nonsense siRNA transfizierten Kontrollen, war in den Hep3B und den HuH-7 Zellen eine signifikante Reduktion der Vitalität nach Inhibierung mit den SIAH-spezifischen siRNAs zu erkennen. Eine Reduktion von SIAH-1 führte zu einer signifikanten Vitalitätsreduktion von bis zu 63% ab Tag 3 nach Inhibierung ($p < 0,001$). Eine Abnahme der Vitalität um bis zu 64% konnte nach Inhibierung von SIAH-2 gemessen werden (ab Tag 3; $p < 0,001$). Die Doppelinhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 führte ebenfalls zu einer signifikanten Vitalitätsreduktion, jedoch konnten keine additiven Effekte im Vergleich zu den SIAH-Einzelinhibierungen beobachtet werden (bis zu 67%, $p < 0,001$).

3.4.2 SIAH-1 und SIAH-2 sind Regulatoren der Proliferation und Tumorzellapoptose

Es wurde der Einfluss der genspezifischen transienten Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 auf die Proliferation in Hep3B (Abb. 19A) und HuH-7 (Abb. 19B) Zellen mit Hilfe eines BrdU-ELISAs untersucht. Die relative Anzahl proliferierender Zellen wird dabei durch den Einbau des Brom-markierten dUTPs als Basenanalogen in die DNA 3 Tage nach Inhibierung bestimmt.

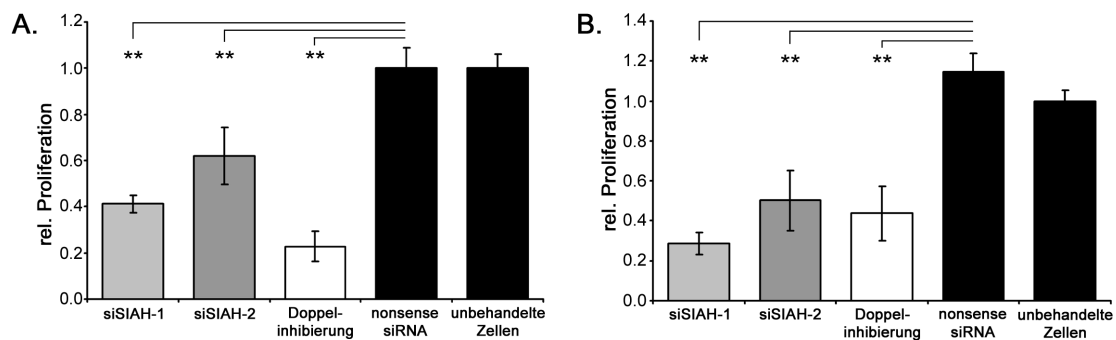


Abbildung 19: Einfluss der SIAH-Reduktion auf die Zellproliferation in HCC-Zellen

Drei Tage nach der transienten Transfektion der genspezifischen siRNA wurde die relative Proliferationsrate in Hep3B Zellen (A) und HuH-7 Zellen (B) bestimmt. Es wurden dabei sowohl die Einzelinhibierungen (SIAH-1: hellgrauer Balken; SIAH-2: dunkelgrauer Balken) wie auch die Doppelinhibierung (weißer Balken) im Vergleich zu nonsense siRNA transfizierten und unbehandelten Zellen (Kontrollen: schwarze Balken) betrachtet. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 6 unabhängigen Messwerten mit Standardabweichungen.

Für SIAH-1 konnte eine signifikante Reduktion der Proliferation in Hep3B Zellen (-59%, $p < 0,01$; Abb. 19A) sowie in HuH-7 Zellen (-71%; $p < 0,01$; Abb. 19B) festgestellt werden. In

Hep3B konnte nach SIAH-2 Inhibierung eine 38%ige Reduktion ($p < 0,01$; Abb. 19A) und in HuH-7 eine 50%ige Reduktion ($p < 0,01$; Abb. 19B) für SIAH-2 beobachtet werden. Die Doppelinhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 führte ebenfalls zu einer signifikanten Proliferationsminderung der transfizierten Zellen (Hep3B: -77%, $p < 0,01$; HuH-7: -56%, $p < 0,01$). Diese Verringerung der Teilungsrate der Hep3B Zellen war in der Doppelinhibierung niedriger als bei der jeweiligen Einzelinhibierungen. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in Experimenten mit HuH-7 Zellen bestätigen werden.

Da der Einfluss von SIAH-1 und SIAH-2 auf die Zellteilung nicht alleinig für den „Brutto“-Vitalitätsverlust verantwortlich sein muss, wurde ebenfalls die Apoptoserate der Tumorzellen nach SIAH-1 und/oder SIAH-2 Reduktion analysiert.

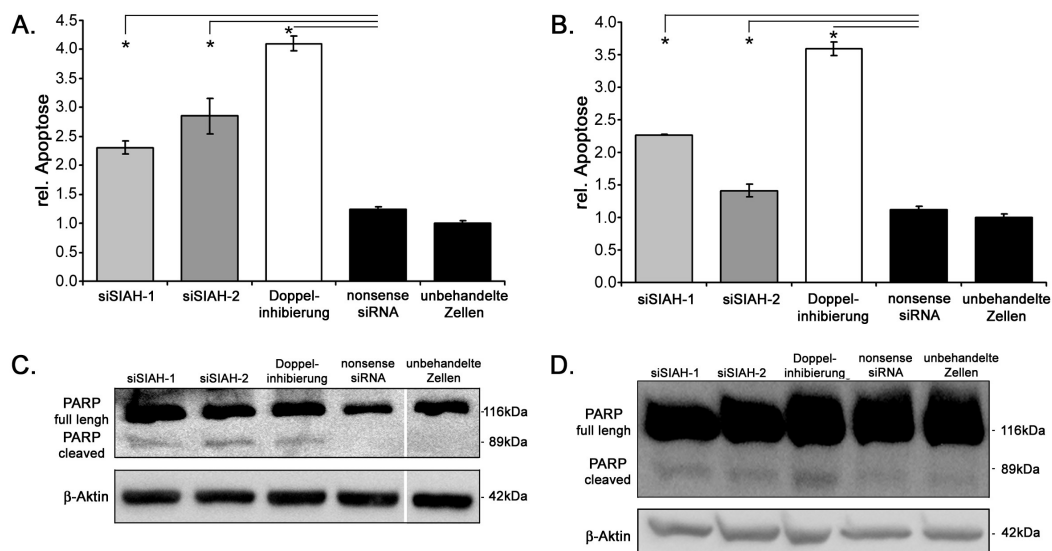


Abbildung 20: Einfluss von SIAH-1 und SIAH-2 auf die Apoptose in HCC-Zellen

Hep3B (A) und HuH-7 (B) wurden in Dreifachansätzen mit SIAH-1 und/oder SIAH-2 spezifischer siRNA transfiziert und nach drei Tagen die Apoptoserate (FACS-Analyse) oder die Caspase-abhängige Spaltung von PARP untersucht. In FACS-Analysen wurde anhand der Fluoreszenzintensität, die mit der DNA-Degradation in apoptotischen Zellen korreliert, die Apoptoserate nach Inhibierungen (SIAH-1: hellgraue Balken; SIAH-2: dunkelgraue Balken; Doppelinhibierung: weiße Balken) im Vergleich zu den Kontrollen (schwarze Balken) bestimmt. Zur Bestätigung der Daten wurden daneben auch die PARP-Spaltung mittels Western Blot Analyse bestimmt (Hep3B – C; HuH-7 - D). Die Menge der PARP-Spaltprodukte korrelierte hierbei mit der Aktivität der sogenannten Effektorcaspasen.

Die Apoptoserate der Tumorzellen nach Transfektion der SIAH-spezifischen siRNAs wurde mittels FACS-Analytik quantifiziert. Mit Hilfe der FACS-Analyse kann durch den DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid der Degradationszustand der DNA untersucht

werden. Dies lässt Rückschlüsse auf den Apoptosestatus der Zellen zu, da die Fragmentierung der genomischen DNA ein Kennzeichen der fortgeschrittenen Apoptose ist. Des Weiteren erlaubt diese Methode Rückschlüsse auf die Verteilung der Zellen innerhalb des Zellzyklus. Die alleinige Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 bewirkte eine moderate, aber signifikante Induktion der Apoptose sowohl in Hep3B (Abb. 20A; bis zu 2,9-fach; $p < 0,05$) wie auch in HuH-7 Zellen (Abb. 20B; bis zu 2,3-fach; $p < 0,05$). Die Doppelinhibierung der SIAH-Familienmitglieder zeigte eine immer noch moderate, aber deutlichere Steigerung der Apoptoserate in beiden untersuchten Modellsystemen (bis zu 4,2-fach; $p < 0,05$). Signifikante additive Effekte durch die kombinierte Reduktion von SIAH-1 und SIAH-2 konnte auch bei der Untersuchung der Apoptose im Vergleich zu den Einzelinhibierungen nicht verzeichnet werden (Abb. 20). Es konnte kein signifikanter Einfluss auf den Zellzyklus nach Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 beobachtet werden.

Aufgrund der geringen Veränderung der Apoptoserate nach Inhibierung beider Ubiquitin-Ligasen, wurde eine unabhängige Analysemethode zur Darstellung dieser biologischen Effekte gewählt. Der proteolytische Abbau des DNA-Reparaturenzyms PARP (Poly [ADP-Ribose] Polymerase-1) durch die Effektor-Caspase-3 kann als Indikator für die Induktion der Apoptose genutzt werden. Für die Reduktion der SIAH-Familienmitglieder, in den Einzel- wie auch Doppelinhibierungen konnte eine moderate und vergleichbare Induktion der PARP-Spaltung in das 89 kDa große Spaltprodukt nachgewiesen werden. Die nonsense siRNA Transfektion zeigte im Vergleich zu unbehandelten Zellen in keiner der durchgeführten Analysen einen Einfluss auf die Apoptose der Tumorzellen.

3.4.3 Bestimmung der Klonogenität nach Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2

Um die wachstumsfördernden Effekte von SIAH-1 und SIAH-2 auf HCC-Zellen näher zu untersuchen, wurden Klonogenitätsassays nach der spezifischen Inhibierung der Ubiquitin-Ligasen durchgeführt. Diese ermöglichten die Analyse des Zellwachstums zu Kolonien nach Modulation der SIAH Expression und lassen so Aussagen über die protumorigenen Eigenschaften der SIAH-Familienmitglieder zu.

Wie die Daten der Proliferationsanalyse andeuteten, konnte eine Reduktion der Klonogenität in Hep3B (Abb. 21A) und HuH-7 Zellen (Abb. 21B) nach SIAH-1 und SIAH-2 Inhibierung im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen nachgewiesen werden. Für die alleinige Reduktion von SIAH-1 zeigte sich eine bis zu 32%ige Verminderung, für die Reduktion von SIAH-2 eine bis zu 24%ige Verminderung des Koloniewachstums. Die

kombinierte Transfektion der SIAH-spezifischen siRNAs zeigte eine bis zu 30%ige Reduktion im Vergleich zu den nonsense siRNA transfizierten und unbehandelten Zellen und ist somit nicht größer als der Einfluss der Einzelinhibierungen von SIAH-1 und SIAH-2.

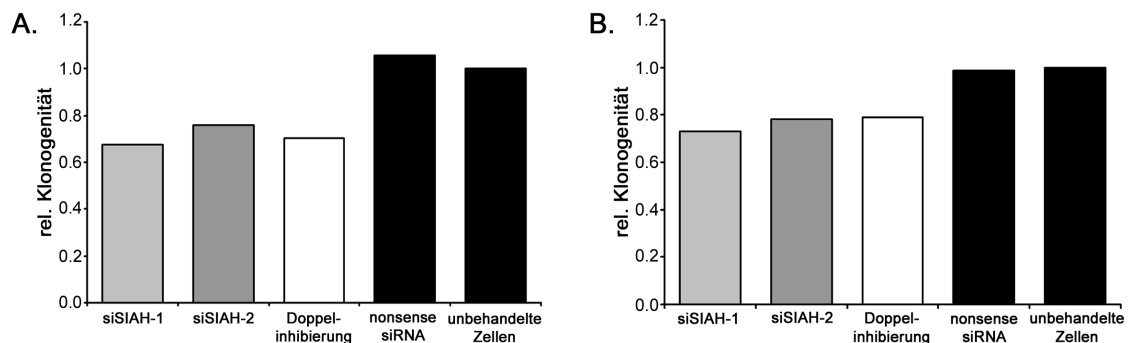


Abbildung 21: Einfluss der SIAH-Reduktion auf das Koloniewachstum von HCC-Zellen

An 5. Tag nach Inhibierung erfolgte die Färbung der sich bildenden Kolonien mittels Kristallviolett. Es wurde die relative Klonogenität der Inhibierungen (SIAH-1: hellgraue Balken; SIAH-2: dunkelgraue Balken; Doppelinhibierung: weiße Balken) im Vergleich zu den Kontrollen (schwarze Balken) in Hep3B (A) und HuH-7 (B) Zellen bestimmt.

3.4.4 Einfluss der Reduktion von SIAH-1 und SIAH-2 auf die Migration von HCC-Zellen

Die bisherigen Daten belegen, dass SIAH-Familienmitglieder Regulatoren von Zellteilung und anti-Apoptose sind und somit am Tumorwachstum beteiligt sein können. Aufgrund des Einflusses von E3 Ligasen auf zahlreiche Zielstrukturen, welche u.a. auch die Mikrotubulusdynamik beeinflussen (z.B. Kid)¹²⁵, ist auch eine Beeinflussung der Tumorzellmotilität denkbar. SIAH-1 wurde bereits im Zusammenhang mit der Regulation der Zellmotilität diskutiert.¹²⁸ Aus diesem Grund erfolgt die systematische Analyse der Migrationsfähigkeit von Hep3B und HuH-7 Zellen nach Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 mit Hilfe eines 2-dimensionalen Scratch-Assays, welcher eine Maß für die Motilität von Zellen unabhängig von dem Vorhandensein einer extrazellulären Matrix ist.

Die Zellen wurden wie unter 2.8.4 beschrieben transient transfiziert und am 4. Tag nach Inhibierung die relative Migration bestimmt (Abb. 22). Die Einzelinhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 zeigte eine signifikante Verminderung der Migrationsfähigkeit in Hep3B (Abb. 22A; SIAH-1: -49%, $p < 0,001$; SIAH-2: -34%, $p < 0,001$) und HuH-7 (Abb. 22B; SIAH-1: -12%, $p < 0,01$; SIAH-2: -5%, $p < 0,05$). Eine kombinierte Reduktion der E3-Ubiquitin-Ligasen belegte eine vergleichbare Reduktion der Migration in den verwendeten Modellsystemen (bis zu 48%ige Migrationshemmung, $p < 0,001$) im Vergleich zur

transienten Transfektion mit nonsense siRNA oder unbehandelten Zellen.

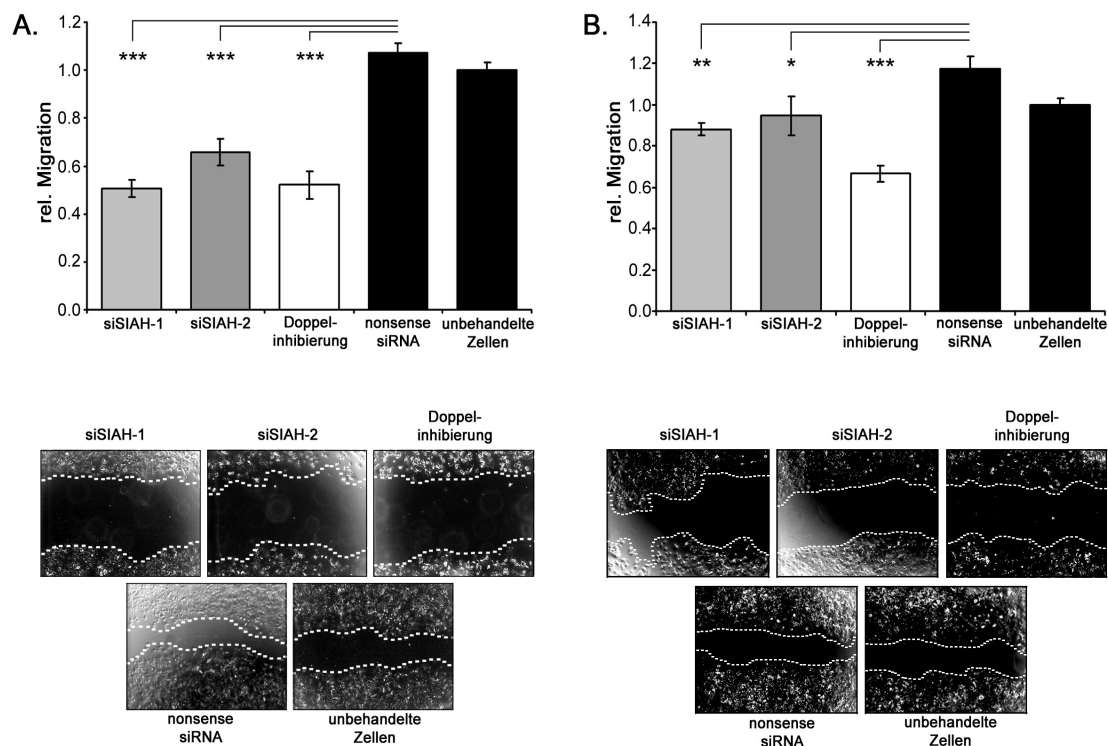


Abbildung 22: SIAH-1 und SIAH-2 regulieren die Migrationsfähigkeit von HCC-Zellen

Für die Bestimmung der relativen Migration wurde ein Scratch-Assay am 4. Tag nach Inhibierung durchgeführt. Dabei wurde die HGF-induzierte Migration nach Inhibierungen (SIAH-1: hellgraue Balken; SIAH-2: dunkelgraue Balken; Doppelinhibierung: weiße Balken) im Vergleich zu den Kontrollen (schwarze Balken) ermittelt, digital dokumentiert und die freie, nicht durch Zellen aktiv geschlossene Fläche gemessen. Um proliferations-bedingte Effekte der Tumorzellen auf den Schluss des Scratches ausschließen zu können, wurde die Proliferation chemisch unterdrückt (Mitomycin C). Die zellfreien Areale sind mit einer gestrichelten Linie markiert.

3.5 SIAH-Inhibierung sensibilisiert HCC-Zellen gegenüber die Behandlung mit Chemotherapeutika

Der Einfluss der SIAH Ligasen auf unterschiedliche tumor-relevante Prozesse verdeutlicht die zentrale Funktion der Enzyme im Tumorwachstum und Tumorzell dissemination. Insbesondere die Erhöhung der Tumorzellapoptose nach Verringerung der SIAH Bioaktivität deuten darauf hin, dass die Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 Tumorzellen gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika sensibilisieren könnte. Aus diesem Grund wurde die HCC Zellvitalität von Hep3B Zellen nach Applikation von subtoxischen Konzentrationen von Cisplatin, Vinblastin und Paclitaxel untersucht. Cisplatin inhibiert

durch inter- und intramolekulare Querverbindungen der DNA-Stränge, die DNA-Replikation und durch die Bindung an freie Sulfhydryl-Gruppen des Tubulins dessen partielle Depolymerisierung. Cisplatin wird bei der Therapie des HCC und von Hoden- oder Ovarialkarzinomen angewandt. Vinblastin gehört zur Gruppe der Vincaalkaloide und beeinträchtigt die Mikrotubulusdynamik durch Interaktion mit dem Monomer Tubulin. Hierbei wird der Prozess der Mikrotubuluspolymerisation gehemmt und die Tumorzellmitose unterbunden. Es wird u.a. bei der Behandlung von Lymphdrüsentumoren und Nierenzellkarzinomen eingesetzt. Paclitaxel gehört zur Gruppe der Taxane und ist ebenfalls ein Mitosehemmer, der im Gegensatz zu Vinblastin die Depolymerisation des Mikrotubulusnetzwerkes inhibiert. Paclitaxel wird zur Behandlung von u.a. Ovarialkarzinome, Mammakarzinome, Bronchialkarzinome und Prostatakarzinome verwendet.

Konzentrationskinetik der Wirkstoffe

Um den Grad der Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber der Behandlung mit diesen Substanzen analysieren zu können, wurden zunächst die vitalitätsreduzierenden Effekte der Chemotherapeutika in Abhängigkeit von ihrer Konzentration auf Hep3B-Zellen getestet (Abb. 23). Alle drei verwendeten Substanzen wurden mit einer Endkonzentration von 0,1 nM, 1 nM und 10 nM eingesetzt. Nach 24 Stunden erfolgte die Messung der Zellvitalität mittels eines MTT-Tests.

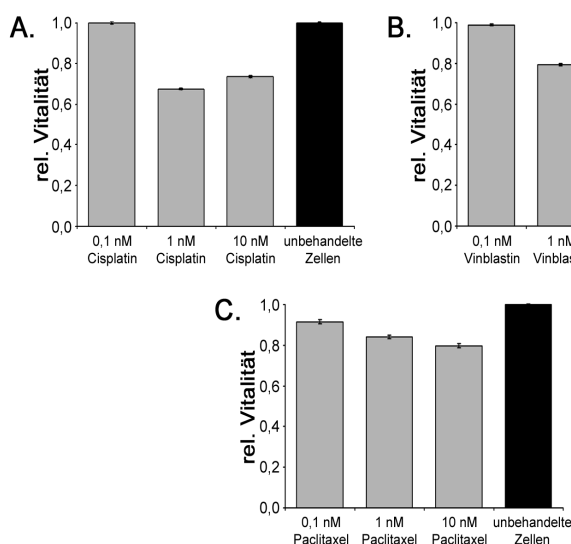


Abbildung 23: Einfluss der Zytostatikakonzentration auf die HCC-Zellvitalität

Hep3B-Zellen wurden mit Cisplatin (A), Vinblastin (B) und Paclitaxel (C) in einem Konzentrationsspektrum von 0,1 nM bis 10 nM für 24 Stunden inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Als Kontrollen und Kalibrator dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte aus 8 Messwerten mit der entsprechenden Standardabweichung.

Für alle drei verwendeten Chemotherapeutika konnte kein signifikanter Einfluss auf die

Vitalität bei einer Konzentration von 0,1 nM verzeichnet werden. Die 24-stündige Behandlung der Zellen mit 1 mM Cisplatin (Abb. 23A) bewirkte eine Reduktion der Zellvitalität um 30%. Höhere Konzentrationen von Cisplatin führten zu keiner weiteren Vitalitätsreduktion. Vinblastin (Abb. 23B) zeigte bei einer Konzentration von 1 nM eine Abnahme der Vitalität von 21% und bei einer Konzentration von 10 nM eine Abnahme von 31% der Vitalität. Nach der Behandlung mit 1 nM Paclitaxel (Abb. 23C) wurden 16% und für 10 nM Paclitaxel 20% Vitalitätsreduktion nachgewiesen. Für alle weiterführenden Experimente wurden die niedrigsten Konzentrationen der Medikamente gewählt, bei denen erste erkennbare zytotoxische Effekt beobachtet werden konnten (jeweils 1 nM).

Applikation von Chemotherapeutika nach Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2

Um eine mögliche Sensibilisierung der Tumorzellen nach Reduktion der SIAH Aktivität zu analysieren, wurden HCC Zellen initial mit den genspezifischen siRNAs für SIAH-1 und SIAH-2 sowohl in Einzel- als auch Doppelinhibierung transfiziert. Nach 48 Stunden begann die Behandlung mit dem jeweiligen Chemotherapeutikum (1 nM) für weitere 24 Stunden, um anschließend die Zellvitalität mittels MTT-Test zu bestimmen. Als Kontrollen dienten neben unbehandelten Zellen auch Zellen, die nur mit den entsprechenden Wirkstoffen oder mit nonsense siRNA transfiziert und mit der entsprechenden Substanz behandelt wurden (Abb. 24).

Nach Inhibierung der SIAH Ligasen konnte ebenso eine signifikante Reduktion der Tumorzellvitalität nachgewiesen werden (siehe 3.4.1) wie auch nach der alleinigen Behandlung mit den Chemotherapeutika. Eine zusätzliche Behandlung der transfizierten Zellen mit den Chemotherapeutika (Cisplatin Abb. 24A; Vinblastin Abb. 24B; Paclitaxel Abb. 24C) zeigte eine signifikante Verstärkung der Vitalitätsreduktion im Vergleich zu den alleinigen Inhibierungen bzw. der Behandlung der HCC-Zellen mit den Zytostatika. Die stärkste Vitalitätsreduktion konnte durch die Behandlung mit Vinblastin nach SIAH-1 und kombinierter SIAH-1/-2 Inhibierung erzielt werden. Diese Behandlung führte zu einer signifikanten Verstärkung der Vitalitätsreduktion um ca. 56% im Vergleich zu SIAH-1 Einzelinhibierung ($p < 0,001$). Die Kombination von Doppelinhibierung und 1 nM Vinblastin führte zu einer Reduktion der Vitalität um weitere 76% im Vergleich zur Doppelinhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 ($p < 0,001$). Diese Resultate verdeutlichen, dass die effiziente Inhibierung von SIAH Familienmitgliedern (und hier vor allem die kombinierte Reduktion der SIAH-1 und SIAH-2 Bioaktivität) zu einer signifikanten

Sensibilisierung von HCC Zellen gegenüber der Behandlung mit zytotoxischen Substanzen führte. Insbesondere bei der Verwendung von Mikrotubulus-destabilisierenden Substanzen (Vinblastin) mit der SIAH-1/-2 Inhibierung konnte eine maximale Vitalitätsreduktion (Restvitalität 4%) der HCC Tumorzellen erzielt werden. Die effektive Reduktion der Bioaktivität von nukleärem SIAH-1 und SIAH-2 ist somit eine effiziente Möglichkeit zur Sensibilisierung von HCC-Zellen und stellt eine neue und interessante Therapieoption z.B. bei der Entwicklung kleiner inhibitorischer Moleküle dar.

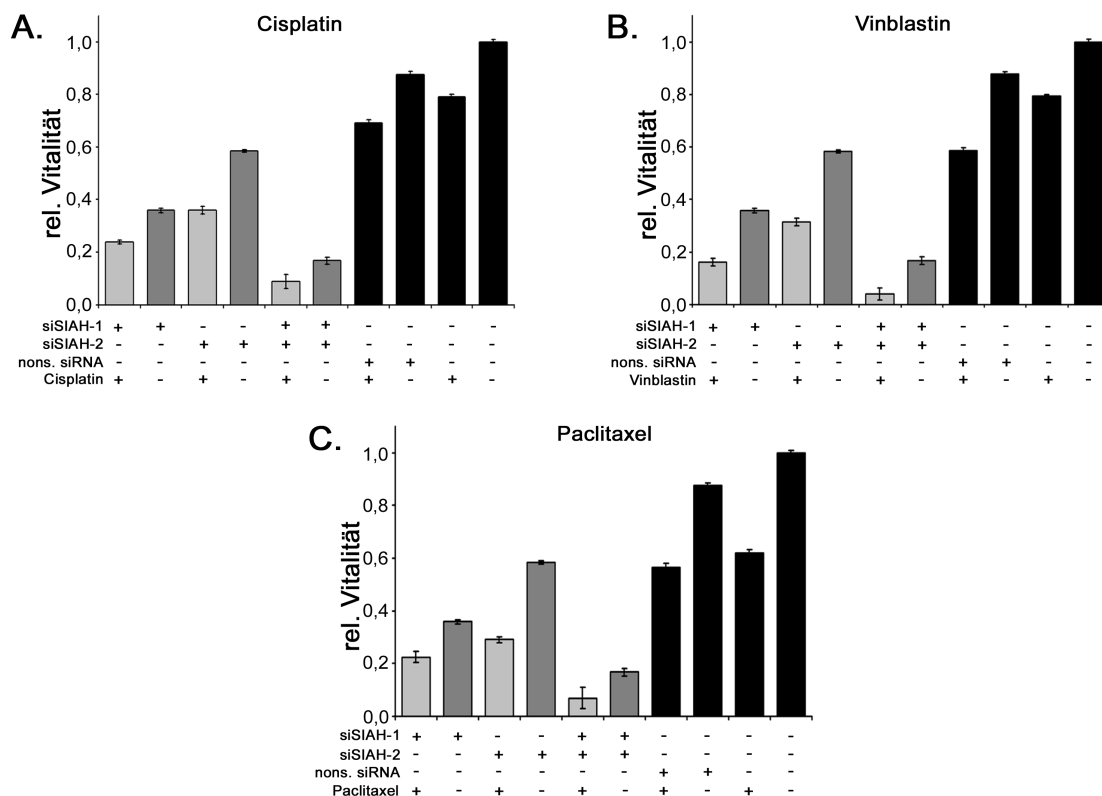


Abbildung 24: Vitalitätsreduktion von HCC Zellen durch kombinierte siRNA- Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 und Applikation von Zytostatika

An Tag 3 nach Inhibierung der SIAH-Ligasen wurde die 24-stündige Behandlung mit je 1 nM Cisplatin (A), Vinblastin (B) und Paclitaxel (C) begonnen. Im MTT-Test wurden die Effekte der siRNA Transfektionen plus Wirkstoffgabe (hellgraue Balken) im Vergleich zu den verschiedenen Kontrollen analysiert (Inhibierungen alleine - dunkelgraue Balken; nonsense siRNA Transfektion mit und ohne Wirkstoff, Wirkstoff alleine und unbehandelte Zellen - schwarze Balken).

3.6 p53-abhängige Regulation von SIAH Ligasen in HCC-Zellen

In verschiedenen *in vitro* Modellsystemen wie Lymphomzelllinien oder Nierenzellkarzinomzelllinien wurde SIAH-1 als positives Zielgen des Tumorsuppressorgens p53 beschrieben.^{99, 108, 129-132} Aufgrund des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Funktionsverlust von p53 in HCC Zellen und der zu beobachtenden Reduktion der SIAH-1 Expression, wurde in verschiedenen HCC Modellsystemen überprüft, ob ein *“loss of function”* von p53 für die beobachtete, verringerte SIAH-1 Expression verantwortlich sein kann.

In einem ersten Ansatz wurden p53-transfizierte Hep3B Zellen (normalerweise p53^{-/-}) genutzt (Abb. 25), welche eine temperatursensitive p53-Mutante (p53Val135) exprimieren. Durch den Wechsel der Kultivierungstemperatur auf 32°C kommt es zu einer Konformationsänderung des p53, welche die Bildung einer transkriptionell aktiven p53 Isoform induziert.

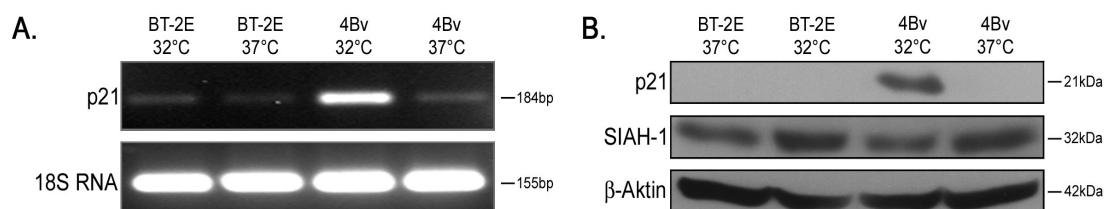


Abbildung 25: SIAH-1-Expression nach temperatur-induzierbaren Expression von transkriptionell aktivem p53 in Hep3B Zellen

Die p53-transfizierten Hep3B-Zellen (4Bv – temperatursensitive Mutante; BT-2E – Kontrollzellen) wurden für 24 Stunden bei 37°C und 32°C (permissive Temperatur) kultiviert. Anschließend erfolgte die Kontrolle der p53-Induktion auf mRNA-Ebene (A) und Proteinebene (B) durch den Nachweis des p53 Zielgens p21. Parallel erfolgte die Analyse der SIAH-1 Expression unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen auf Proteinebene (B).

Da die transkriptionell aktive p53-Isoform im Western Blot nicht analysiert werden kann, erfolgte der Beleg der p53-Induktion über den Nachweis des p53-Zielgens p21. Zum Einen ist eine Induktion von p21 bei der permissiven Temperatur (32°C) in der temperatursensitiven Mutante (4Bv) auf mRNA-Ebene im Vergleich zur Kontrollzelllinie (BT-2E) und den beiden Zelllinien bei 37°C zu beobachten (Abb. 25A). Auch auf Proteinebene konnte eine deutliche Induktion von p21 in den 4Bv-Zellen bei 32°C im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden (Abb. 25B). Eine Änderung der SIAH-1 Expression konnte unter keiner der beschriebenen Kulturbedingungen verzeichnet werden.

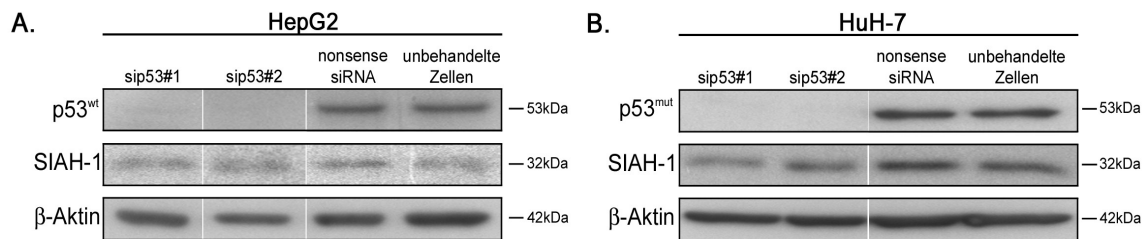


Abbildung 26: Einfluss der Inhibierung von wildtypischem und mutiertem p53 auf die SIAH-1 Expression

In HepG2 (A) und HuH-7 (B) wurde mittels spezifischer siRNA p53 inhibiert. Anschließend wurde der SIAH-1 Expressionsstatus ermittelt.

In einem unabhängigen Ansatz wurden die Auswirkungen der Expression von wildtypischem und mutiertem p53 auf die Expression von SIAH-1 und SIAH-2 analysiert (Abb. 26). Hierzu wurden HepG2-Zellen (wildtyp (wt) p53; Abb. 26A) und HuH-7-Zellen ("gain of function" Mutation von p53;¹²⁴ Abb. 26B) für die Untersuchungen genutzt. Die Zellen wurden mit p53-spezifischer siRNA transfiziert und an Tag 3 nach Inhibierung die Gesamtproteinlysate isoliert. In beiden Zelllinien konnte eine effiziente Reduktion der p53^{wt/mut} Expression erzielt werden. Es konnte auch in diesem Versuchsansatz keine Änderung des SIAH-1 Status beobachtet werden, was belegt, dass sowohl wildtypisches als auch mutiertes p53 keine regulatorischen Effekte auf die SIAH-1 Expression ausübt.

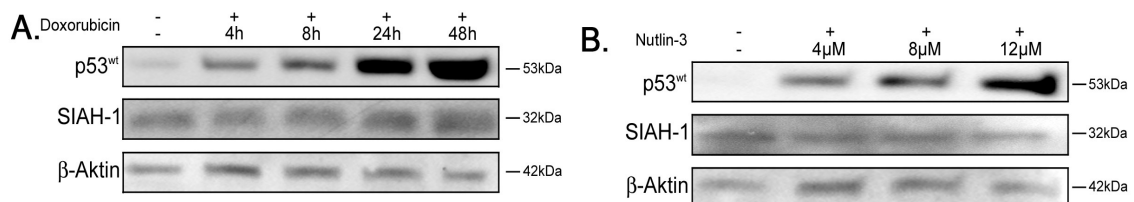


Abbildung 27: Einfluss der Expression von p53^{wt} auf die SIAH-1 Expression

(A) HepG2 Zellen wurden mit Doxorubicin über 48 Stunden behandelt und der p53 bzw. SIAH-1 Expressionsstatus bestimmt. Des Weiteren erfolgte die Behandlung mit Nutlin-3 (4μM, 8 μM, 12 μM) und die Bestimmung des p53 und SIAH-1 Status.

Um die p53-Unabhängigkeit der SIAH-1 Expression zu bestätigen, wurden HepG2 Zellen mit Doxorubicin, einem DNA-interkalierendem Zytostatikum, behandelt (Abb. 27A). Doxorubicin bindet nichtkovalent an die DNA und verhindern die Bindung von Polymerasen, wodurch die Replikation gestört wird. Auf zellulärer Ebene stellt die Doxorubicinbehandlung eine Stresssituation für eine Zelle dar, welche zu einer Induktion von p53 führt. Die Behandlung mit 1 μM Doxorubicin wurde über 48 Stunden

durchgeführt und zu definierten Zeitpunkten die Gesamtproteinlysate isoliert. Es konnte eine verstärkte Expression von p53 und eine moderate Änderung der SIAH-1 Expression verzeichnet werden, welche wahrscheinlich auf die durch Doxorubicin induzierte Apoptose zurückzuführen ist. Neben der Änderung der p53-Expression durch DNA-Schädigung, wurde auch die Analyse von HepG2 Zellen nach Behandlung mit Nutlin-3, einem MDM-2 Antagonisten, durchgeführt (Abb. 27B). Dafür wurden die Zellen mit 4 μ M, 8 μ M und 12 μ M Nutlin-3 versetzt und die Zellen nach 24 Stunden aufgearbeitet und analysiert (Abb. 27B). Auch unter diesen Bedingungen konnte eine Induktion der p53-Expression, aber keine Änderung des SIAH-1 Expressionsniveaus beobachtet werden. Somit können für HCC Zellen direkte regulatorische Effekte von p53 auf die SIAH-1 Expression ausgeschlossen werden.

3.7 Identifizierung von SIAH Zielstrukturen in HCC Zellen

Nachdem der Einfluss der Reduktion von SIAH-1 und SIAH-2 auf die protumorigenen Effekte in HCC-Zellen untersucht wurde, sollten die zu Grunde liegenden molekularen Effektor-Mechanismen näher analysiert werden, durch welche die nukleäre Expression der beiden Ubiquitin-Ligasen die HCC-Tumorzellproliferation und Migration vermittelt. Bisher konnten über 50 beschriebene Bindungspartner für die SIAH-Familienmitglieder (insbesondere für SIAH-1) identifiziert werden.¹¹⁰ Es wurde deshalb die Expression von ausgewählten Bindepartnern nach Inhibierung, welche einen potentiellen Einfluss auf Tumorzellproliferation und Migration vermuten lassen, näher untersucht. Zu diesen gehören β -Catenin (ein Coaktivator der TCF Transkriptionsfaktorfamilie), BAG-1 (ein Regulator der Apoptose) oder T-Star (ein Regulator des RNA-*Splicing*-Prozesses). Die an Tag 3 nach SIAH-1 und SIAH-2 Inhibierung isolierten Gesamtproteinextrakte wurden mittels Western Blot Analyse auf die Expression dieser Bindepartner und eines potentiellen Bindepartners (FIR; *FBP-interacting-repressor*) hin untersucht (Hep3B Abb. 3.25A; HuH-7 Abb. 28B). Des Weiteren wurde die Auswirkung auf die Expression von FBP (*far upstream element sequence (FUSE)-binding protein*)-Familienmitglieder, welche zum Teil direkt mit FIR interagieren, analysiert.

Die Analyse der beschriebenen Interaktionspartner BAG-1, T-Star und β -Catenin zeigte keine Änderung der Expression nach Reduktion der SIAH-Familienmitglieder. Ebenso konnte für den potentiellen Interaktionspartner FIR keine Regulation detektiert werden. Es wurde jedoch in beiden Zelllinien eine deutliche Verminderung von FBP-1 durch die

SIAH-2 und von FBP-3 durch die SIAH-1 Inhibierung nachgewiesen werden. Nach Doppelinhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 konnte die Verminderung von FBP-1 und FBP-2 ebenfalls beobachtet werden.

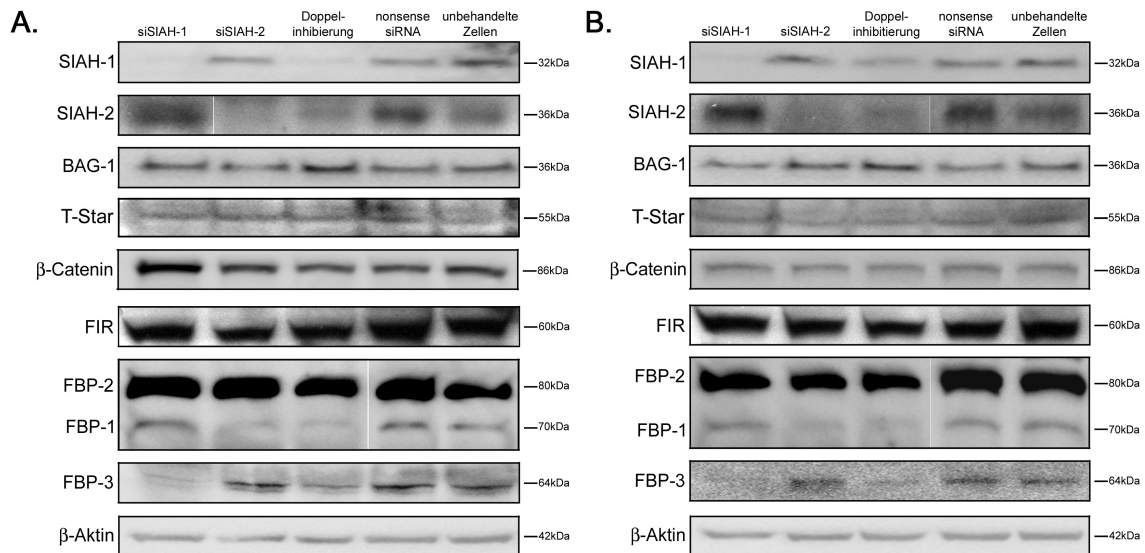


Abbildung 28: Auswirkung der SIAH-spezifischen Inhibierung auf potentielle Interaktionspartner
Drei Tage nach der Transfektion der SIAH-1 und SIAH-2 spezifischen siRNA in Hep3B (A) und HuH-7 (B) Zellen wurden Proteinextrakte auf den Expressionsstatus verschiedener Zielgene (β-Catenin, BAG-1, T-Star, FIR) und FBP-Familienmitglieder, im Vergleich zu den nonsense siRNA-behandelten und unbehandelten Zellen analysiert.

Der Zusammenhang zwischen der Expression von SIAH-Ligasen und FBPs konnte auch auf mRNA Ebene bestätigt werden (Abb. 29). Wie die Daten der Proteinanalyse andeuteten, konnte eine signifikante Reduktion von FBP-1 (bis zu 61%) nach Einzelinhibierung von SIAH-2 und in der Doppelinhibierung beider Ligasen beobachtet werden. Ebenso konnte auch die Reduktion von FBP-3 nach SIAH-1 Einzelinhibierung und SIAH-1/-2 Doppelinhibierung von bis zu 35% festgestellt werden.

Die Inhibierung von Ubiquitin-Ligasen, welche Proteine direkt für die Degradation durch das Proteasom markieren, führt zu einer Akkumulation der Zielproteine. Im Falle der Faktoren FBP-1 und FBP-3 kommt es aber zu einer Abnahme der Proteinkonzentration, was einen indirekten, inversen Zusammenhang zwischen den SIAH-Proteinen und den FBP-Familienmitglieder verdeutlicht. Dieser indirekte Zusammenhang sollte aber dennoch Proteasom- abhängig sein, d.h. auch die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren sollte, analog zur Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2, zu einer Verringerung der FBP-Proteine führen.

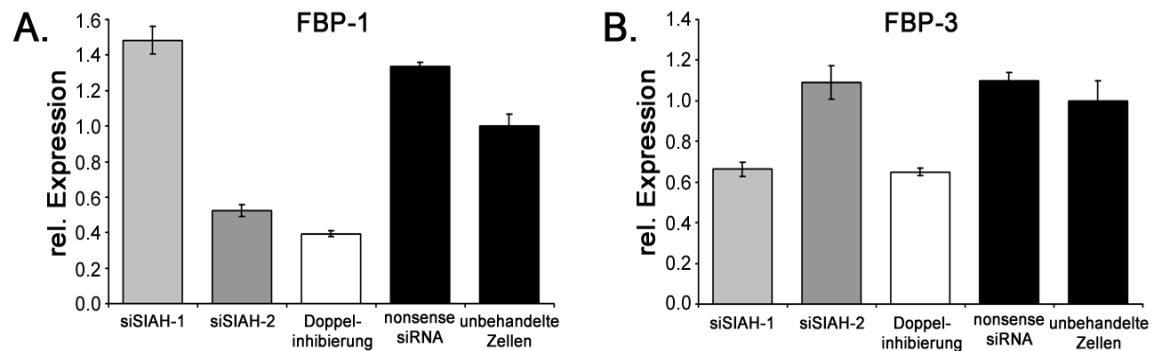


Abbildung 29: Auswirkung der SIAH-spezifischen Inhibierung auf die FBP-Familienmitglieder

An Tag 3 nach Inhibierung der SIAH Ligasen wurde die Gesamt-RNA der Proben isoliert und auf den Expressionsstatus von FBP-1 (A) und FBP-3 (B) mittels semiquantitativer *“real-time”* PCR, im Vergleich zu den nonsense siRNA-behandelten und unbehandelten Zellen überprüft.

Nach der 24-stündigen Behandlung der Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 (5 μ M) konnte eine Expressionsreduktion der FBP-Familienmitglieder im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Lösungsmittel für MG132) in Hep3B (Abb. 30A) und HuH-7 (Abb. 30B) nachgewiesen werden.

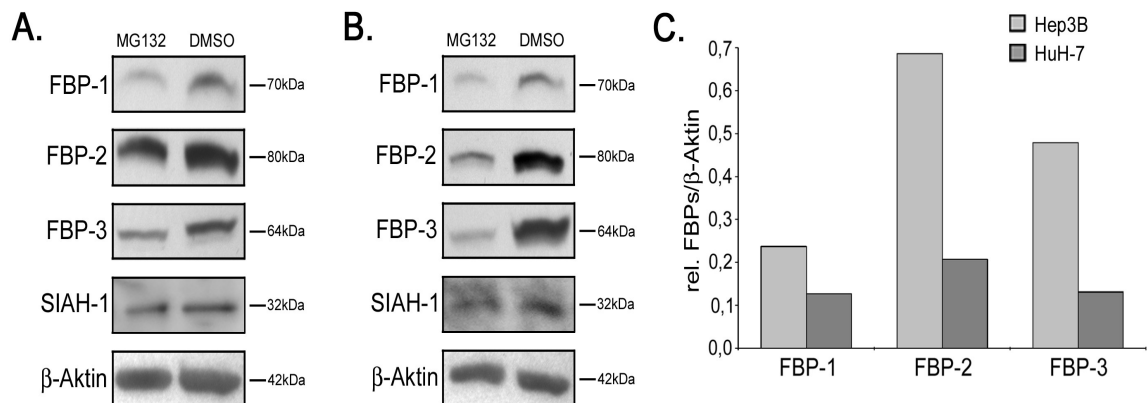


Abbildung 30: Effekt der MG132-Behandlung auf die Bioverfügbarkeit von FBP-Familienmitgliedern

Hep3B (A) und HuH-7 (B) wurden mit dem 26S Proteasominhibitor MG132 behandelt. Nach 24 Stunden wurden Gesamtproteinextrakte isoliert und die Expressionsprofile der FBP-Familienmitglieder und von SIAH-1 im Vergleich zu DMSO-Kontrolle analysiert. SIAH-1 diente als Kontrolle für die spezifische Wirkung des Proteasominhibitors. Die densitometrische Auswertung und Normalisierung gegen die Ladekontrolle Aktin verdeutlicht die Reduktion der Proteinlevel der FBP-Familienmitglieder (C).

Eine densitometrische Auswertung ergab für FBP-1 eine bis zu 88%ige und für FBP-3 eine bis zu 87%ige Reduktion nach MG132 Behandlung. Auch für das Familienmitglied FBP-2

konnte ein verringertes Proteinniveau nach Behandlung mit MG132 festgestellt werden (bis zu -79%). Diese Daten belegen den Zusammenhang zwischen der Aktivität von SIAH-1 und SIAH-2 als Ubiquitin-Ligasen und dem proteasomalen Abbau von Faktoren, welche sekundär für die Bioverfügbarkeit der FBP-Familienmitglieder in HCC Zellen verantwortlich sind.

3.7.1 Der Transkriptionsfaktor FBP-3 in der Hepatokarzinogenese

Die generierten *in vitro* Daten deuten darauf hin, dass die Familie der FBP-Transkriptionsfaktoren im HCC überexprimiert vorliegen. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass FBP-1 im Rahmen der Hepatokarzinogenese in >70% aller HCCs überexprimiert vorliegt (Promotionsarbeit Mona Malz, AG Molekulare Hepatopathologie, persönliche Kommunikation). Um ebenfalls die FBP-3 Expression in HCCs zu analysieren, wurden FBP-3 spezifische semiquantitative “*real-time*” PCR-Analysen in primären HCCs (n = 48) im Vergleich zu einem Gemisch aus normalen Lebern (n = 3) durchgeführt (Abb. 31 A).

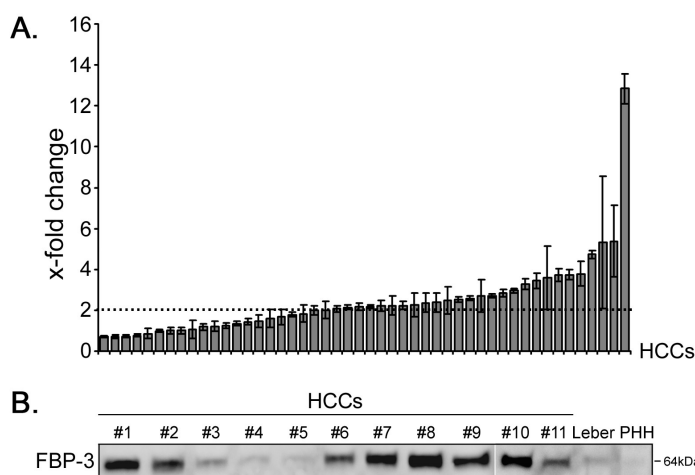


Abbildung 31: Expression von FBP-3 im humanen HCC

Unter Verwendung der semiquantitativen “*real-time*” PCR-Analyse wurde das Transkriptlevel von FBP-3 analysiert (A). Die horizontale Linie repräsentiert die 2-fache Expressionsänderung im Vergleich zur normalen Leber (Mittelwert aus 3 Lebern). Des Weiteren wurde der Expressionsstatus von FBP-3 auf Proteinebene nachgewiesen (B).

Während keine Reduktion von FBP-3 auf Transkriptebeine in 42% der HCCs nachgewiesen werden konnte, zeigten 58% (28/48) der untersuchten HCCs einen Anstieg der FBP-3 Konzentration um mindestens den Faktor 2. Western Blot Analysen mit Proteinlysaten aus HCC Geweben belegen die hohe Expression von FBP-3 in 59% (16/27) der analysierten HCCs (n = 27; Abb. 31B). Die von normaler Leber und primären humanen Hepatozyten (PHH) gewonnen Proteinlysate wiesen nur geringste Mengen an FBP-3 auf.

Um die FBP-3 Überexpression im Prozess der humanen Hepatokarzinogenese zu analysieren, wurden TMAs mit einem FBP-3 spezifischen Antikörper immunhistochemisch untersucht (siehe 2.10.6). Es konnte keine FBP-3 Expression in normalen Hepatozyten nachgewiesen werden, wohingegen in 47% (18/38) der untersuchten DNs eine leichte und in 21% (8/28) eine intensive FBP-3 Färbungen beobachtet wurde (Abb. 32). In den untersuchten HCCs zeigte sich in 28% (34/122) eine leichte und 43% (53/122) eine starke FBP-3 Expression (Abb. 32). In lediglich 29% der HCCs konnte keine FBP-3 Expression nachgewiesen werden. Diese nukleäre Akkumulation korrelierte moderat aber signifikant mit dem Grad der Entdifferenzierung des humanen hepatozellulären Karzinoms ($r = 0,332$, $p < 0,001$).

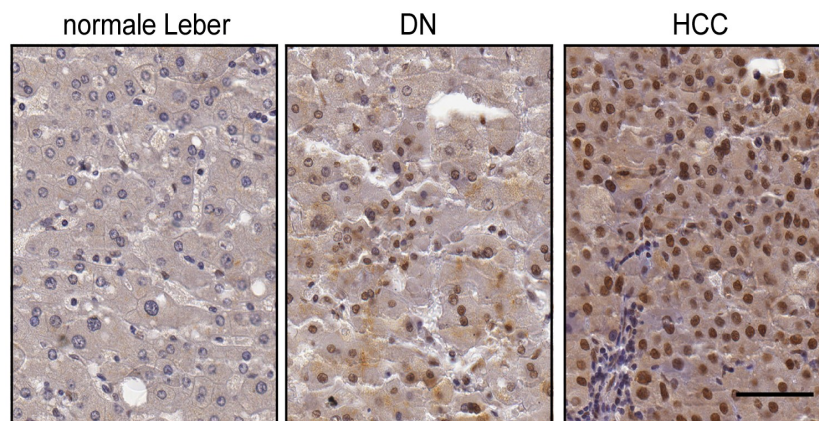


Abbildung 32: Expression von FBP-3 in der Hepatokarzinogenese

Tissue-Micro-Array Analysen von FBP-3 belegen keine Expression in normalem Leberparenchym. Mit dem Grad der Entdifferenzierung ist eine signifikante nukleäre Akkumulation zu verzeichnen. Skala: 100 μ m

In der Gruppe der HCCs konnte keine Korrelation von FBP-3 und SIAH-1 in gut differenzierten HCCs (G1 und G2; 95/123; $r = -0,020$; $p > 0,05$) detektiert werden, jedoch konnte in schlecht differenzierten HCCs eine signifikante Korrelation von nukleärem FBP-3 und nukleärem SIAH-1 beobachtet werden (G3 und G4; 28/123; $r = 0,502$; $p < 0,01$). Die nukleäre Expression von FBP-3 korrelierte des Weiteren mit der Expression des Proliferationsmarker Ki67 ($r = 0,366$; $p < 0,001$). Ebenso zeigten die TMA Daten auch eine hochsignifikante Korrelation zwischen der FBP-1 Überexpression und der nukleären Akkumulation von SIAH-2 ($r = 0,615$; $p < 0,001$).

Somit belegen die TMA Daten eine Korrelation zwischen der nukleären Akkumulation der Ubiquitin-Ligasen SIAH-1 und SIAH-2 und der Überexpression einer Familie von Transkriptionsfaktoren, den FBPs.

4. Diskussion

Obwohl das HCC zu den häufigsten humanen Malignomen mit sehr schlechter Prognose gehört, existieren bis jetzt kaum suffiziente Möglichkeiten der Therapie. Der Tumor spricht kaum auf die Behandlung mit gängigen Chemotherapeutika an und operative Verfahren sind in nur ca. 5% der HCC-Patienten möglich. Diese katastrophale Situation verdeutlicht die Notwendigkeit neue, alternative Therapiemethoden zu entwickeln. Hierbei erscheinen insbesondere molekulare Strukturen von besonderer therapeutischer Relevanz zu sein, welche selber als zentrale Regulatoren die Bioverfügbarkeit von Proliferations-, Apoptose- und Migrations-relevanten Genen modulieren.

Ein Beispiel für die erfolgreiche Entwicklung spezifischer Inhibitoren mit hoher therapeutischer Relevanz sind z.B. Rezeptortyrosinkinase (RTK)-Inhibitoren, welche die oftmals aberrante Aktivität von Wachstumsfaktor-Signalwegen selektiv reduzieren. Solche Rezeptoren sind beispielsweise *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptoren (EGFR, HER1 und HER2 beim Mamma- und Lungenkarzinom)^{133, 134}, c-KIT bei Leukämien und gastrointestinalen Stromatumoren (GIST)^{135, 136} oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Rezeptoren (VEGF-RI und VEGF-RII bei Nierenzellkarzinomen)^{137, 138}. Hochspezifische Antikörper oder niedermolekulare Substanzen binden an definierte Domänen der signaltransduzierenden Kinasen (z.B. ATP-Bindedomänen) und unterbinden so die effiziente Signalweiterleitung, die damit verbundene Überexpression von tumor-relevanten Zielgenen und im folgenden Tumorwachstum und Metastasierung. Für fast alle bekannten und tumor-relevanten Wachstumsfaktor- und Zytokinsignalwege existieren bereits Inhibitoren, welche z.T. schon Einzug in den klinischen Alltag bei der Behandlung von Krebspatienten gefunden haben (z.B. Trastuzumab/Herceptin beim Mammakarzinom,^{139, 140} Imatinib/Glivec bei Glioblastomen, GIST und Philadelphia-Chromosom positiven Fällen der chronisch myeloischen Leukämie,¹⁴¹⁻¹⁴⁴ oder Sorafenib/Nexavar bei Nierenzellkarzinomen und HCCs).^{2, 145} Zur Zeit sind mehr als 20 RTK-Inhibitoren in der klinischen Erprobung, darunter auch vielversprechende Inhibitoren die mehrere Rezeptortypen gleichzeitig blockieren.¹⁴⁶

Zahlreiche Studien belegen mittlerweile, dass auch neben der Aktivierung von Wachstumsfaktorsignalwegen und metabolischen Prozessen, der aberrante proteasomale Abbau zu einer Dysregulation zahlreicher Gene (u.a. auch Onkogene oder Tumorsuppressorgene) beitragen kann.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ So führt z.B. die erhöhte Expression der

Ubiquitin-Ligase MDM2 zu einem vermehrten Abbau des Tumorsuppressorgens p53 in verschiedenen Tumoren.⁸² Aufgrund der Tatsache, dass solche Ligasen an zentraler Stelle die Bioverfügbarkeit sehr vieler und funktionell relevanter Substrate beeinflussen (vergleichbar zu den aktivierenden Signalen von Wachstumsfaktoren), stellt auch diese Enzymklasse eine vielversprechende therapeutische Zielstruktur dar. In der Tat werden zur Zeit zahlreiche Anstrengungen unternommen, die Aktivität von Ubiquitin-Ligasen mit Hilfe von ‚*small molecule*‘ Ansätzen zu inhibieren.¹⁵⁰⁻¹⁵² In diesen experimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von selektiven Ubiquitylierungs-Inhibitoren die Aktivierung typischer onkogener Signalwege (z.B. NFκB abhängige Expression von Zytokinen) reduziert werden kann.¹⁵¹

Zu der Gruppe von E3-Ligasen mit bisher ungeklärten protumorigenen Funktionen und ggf. therapeutischer Relevanz gehören auch die SIAH-Familienmitglieder. Mehrere Arbeitsgruppen konnten unabhängig voneinander zeigen, dass SIAH-1 signifikant reduziert in HCC-Geweben vorliegt.^{52, 101, 153} Ziel dieser Arbeit war es deshalb sowohl SIAH-1 als auch das homologe Familienmitglied SIAH-2 bezüglich der Expression in humanen HCCs zu charakterisieren und die biologische und therapeutische Relevanz dieser Ligasen-Familie zu definieren.

4.1 Regulation, Expression und Lokalisation der Ubiquitin-Ligasen SIAH-1 und SIAH-2 im HCC

In dem untersuchten HCC-Kollektiv konnte eine Reduktion von SIAH-1 mRNA in 33% jedoch keine maßgebliche Änderung für SIAH-2 mRNA nachgewiesen werden. Tatsächlich belegen CGH-Analysen, dass offenbar die in fast 36% der untersuchten HCCs nachweisbaren chromosomalen Verluste des Genlocus (16q12.1) den Grund für die verminderte SIAH-1-Expression darstellen.^{21, 40, 101} Für den SIAH-2 Genlocus (3q25.1) wurden weder nennenswerte Zugewinne (8,8%) noch Verluste (1,9%) auf chromosomaler Ebene identifiziert.^{21, 101} Dies wurde durch hochauflösende Matrix-CGH-Analysen bestätigt, welche einen Verlust des Genlocus von SIAH-1 (16q12.1) in 30,9% der untersuchten HCCs und keine chromosomalen Veränderungen für den SIAH-2 Genlocus (3q25.1) belegten.²² Ein weiterer, unabhängiger Grund für die beobachtete Reduktion von SIAH-1 hätte der in der Literatur beschriebene Zusammenhang zwischen der SIAH-1 Expression und der Aktivität von p53 sein können. SIAH-1 wurde in verschiedenen Zelllinien als positives Zielgen von p53 beschrieben.^{109, 130, 154} Somit würde auch der Funktionsverlust („*loss of*

function“) von p53 in 30% aller HCCs durch Deletionen oder Punktmutationen die beobachtete Reduktion der SIAH-1 Expression erklären. Die Inhibierung, sowohl von wildtypischem als auch mutiertem p53 (Y220C), hat jedoch keinen Einfluss auf die SIAH-1 Expression in HCC Zellen, was auf eine p53-unabhängige Regulation von SIAH-1 in HCC Zellen schließen lässt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass neben der hier analysierten p53 (Y220C) Mutation andere sog. „*gain of function*“ Mutationen in TP53 eine Expressionsreduktion von SIAH-1 verursachen könnten. Insgesamt deuten diese Daten aber darauf hin, dass die SIAH-1 Abhängigkeit von wildtypischem p53 eher ein Zelltyp-spezifischer Effekt ist und im HCC andere, vor allem genomische Verluste für die verringerte Expression der Ubiquitin-Ligase verantwortlich sind. Ob auch weitere, z.B. transkriptionelle Regulationsmechanismen, *gene silencing* durch DNA-Methylierung oder sekundäre Regulationsmechanismen zu der Dysregulation von SIAH-1 im HCC beitragen, ist bisher nicht geklärt.

Neben der quantitativen Reduktion der zytoplasmatischen SIAH-1 Fraktion in HCC Geweben, ist vor allem die nukleäre Akkumulation beider SIAH-Proteine ein häufig zu beobachtendes Ereignis (SIAH-1: 31%; SIAH-2: 62%), welches auch in den HCC Zelllinien nachweisbar war. In der Tat ist für SIAH-1 und SIAH-2 bereits ein sog. *nuclear localization signal* (NLS) beschrieben, was prinzipiell eine Translokation in den Kern ermöglicht.^{155, 156} Daneben war für SIAH-2 in den HCC-Zelllinien auch eine moderate, membranäre Lokalisation zu erkennen. Die subzelluläre Lokalisation von SIAH-2 war mit Hinblick auf bereits beschriebene Bindungspartner durchaus zu erwarten, da mehrere Zielproteine für die SIAH-Ligase Membran-assoziiert vorliegen (z.B. Spry (*sprouty homolog*) oder α -Synuclein).^{157, 158} Ob es auch diese Proteine sind, mit denen SIAH-2 in den HCC Zelllinien interagiert, ist bisher nicht untersucht. Es ist vorstellbar, dass noch weitere, bisher unbekannte membranäre Interaktionspartner an SIAH-2 binden und ggf. durch Ubiquitylierung für den proteasomalen Abbau markiert werden.

Die hier ermittelten Daten deuten darauf hin, dass beide Enzyme in definierten zellulären Zuständen (normale Hepatozyten versus Tumorzellen) präferentiell in distinkten Zellkompartimenten vorkommen und hierbei zelluläre Funktionen unterschiedlich beeinflussen. Vergleichbare Zusammenhänge zwischen Lokalisation und Funktion sind in der Tumorbilogie ein bekanntes Phänomen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der transkriptionelle Kofaktor β -Catenin, der in Abhängigkeit von seiner zellulären Lokalisation

verschiedene Funktionen bedient. Zum einen ist β -Catenin eine integrale Komponente der „*adherens junctions*“ der Zellmembran, in denen es als Interaktionspartner von E-Cadherin und α -Catenin an der intrazellulären Signalweiterleitung von Cadherinen zum Zytoskelett beteiligt ist.^{159, 160} Nach nukleärer Translokation induziert β -Catenin durch Bindung seiner transaktivierenden Domäne an TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen des WNT-Signalweges, wie z.B. c-MYC oder Cyclin D1.^{161, 162} Hinsichtlich der protumorigenen Relevanz dieses Mechanismus konnte für β -Catenin gezeigt werden, dass das Maß der nukleären Akkumulation mit der Tumorprogression verschiedener Tumorentitäten assoziiert ist.^{45, 163, 164}

Auch für E3-Ubiquitin-Ligasen konnte bereits eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation mit der differenziellen Interaktion von definierten Substraten in Verbindung gebracht werden. Die Ubiquitin-Ligase BRCA1 wurde sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert.^{165, 166} Während die nukleäre Lokalisation DNA-Reparaturmechanismen, Zellzykluskontrolle und transkriptioneller Aktivierung assoziiert ist, vermittelt die zytoplasmatische Lokalisation, durch die Bindung an das Kernexport-Rezeptorprotein CRM1 (*chromosome region maintenance 1 protein homolog*) über die funktionelle Rev-Typ NES (*nuclear export sequence*), die pro-apoptotischen Funktionen von BRCA1.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ Diese Funktionen sind mit der Koloakalisation von BRCA1 mit Centrosomen oder Mitochondrien assoziiert.^{171, 172}

Auch die untersuchten SIAH-Familienmitglieder wiesen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen in HCC-Zellen auf, was auf distinkte funktionelle Effekte hindeutet. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass SIAH-Proteine im Zellkern, Zytoplasma und Membran-assoziiert vorkommen können,^{74, 104, 173} wo sie mit verschiedenen Bindepartnern interagieren. Diese unterschiedliche Lokalisation wurde in verschiedenen Modellsystemen gezeigt, jedoch konnte bisher noch nicht die Änderung der Lokalisation im Rahmen einer zellulären Zustandsänderung (hier maligne Transformation) nachgewiesen werden. Bis heute sind über 50 Bindepartner, die im Kern, Zytoplasma oder an der Membran lokalisiert sind, für SIAH-1 und SIAH-2 beschrieben worden, was auch für diese Ligasen distinkte biologische Funktionen in Abhängigkeit von der Lokalisation nahe legt.^{110, 174}

Die Tatsache, dass eine nukleäre Akkumulation von beiden Ligasen nur in Tumorzellen, nicht aber in normalen Hepatozyten zu beobachten war, deutete auf protumorigene Effekte der Kernlokalisation von SIAH-1 und SIAH-2 hin. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, dass für beide Ubiquitin-Ligasen eine signifikante nukleäre Akkumulation im

Prozess der malignen Transformation in der Hepatokarzinogenese beobachtet werden konnte. Darüber hinaus weist die nur schwache und inverse Korrelation zwischen der Akkumulation der E3-Ligasen im Zellkern auf unabhängige Translokations-Stimuli und ggf. auf differenzielle molekulare Transportmechanismen hin. Zusammengefasst unterstreichen diese Daten, dass durch den subzellulären Wechsel von Ubiquitin-Ligasen in einer Änderung bzw. Anpassung der Substratspezifität mit möglicher protumorigener Relevanz resultiert.

Interessanterweise wurde in den HCC-Zelllinien für beide Ubiquitin-Ligasen eine Kolo-kalisation mit dem Mikrotubulus-Spindelapparat während der Mitose beobachtet. Ein mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die direkte Interaktion der SIAH-Proteine mit dem Mikrotubulus-Monomer α -Tubulin und dem Mikrotubulus-interagierenden Faktor Kid (*Kinesin like DNA binding protein*).¹²⁵ Das Protein Kid ist ein Mitglied der Chromosom-assoziierten Kinesin-Familie und interagiert sowohl direkt mit dem Mikrotubulus-Netzwerk als auch mit den Chromatiden im Rahmen der chromosomalen Segregation in der Pro- und Metaphase der Mitose. SIAH-1 wurde als Interaktionspartner von Kid beschrieben, welcher die Ubiquitylierung und den sich anschließenden proteasomalen Abbau von Kid katalysiert.¹⁷⁵ Darüber hinaus konnte durch der Interaktionsstudien gezeigt werden, dass SIAH-1 nicht nur für die Degradation von Kid von Bedeutung ist, sondern auch mitotische Alterationen induziert, welche sich in der Bildung multi-nukleäre Riesenzellen manifestieren.^{125, 176} Die Interaktion von α -Tubulin mit SIAH-1 führt nicht zu einem proteasomalen Abbau des Tubulins; die genaue Funktion bzw. Auswirkungen dieser Interaktion ist bisher nicht geklärt, doch ist bekannt, dass die sekundäre Modifikation von α -Tubulin z.B. durch Phosphat-, Acetyl- und Ubiquitinreste die Polymerisationseffizienz und Stabilität von Mikrotubuli maßgeblich beeinflusst.^{125, 177, 178}

4.2 Protumorigene Funktionen von SIAH-1 und SIAH-2 in der Hepatokarzinogenese

Beide Ubiquitin-Ligasen sind bereits im Zusammenhang mit unterschiedlichen zellulären Prozessen beschrieben worden. SIAH-1 wurde hierbei eine zentrale Regulatorfunktion in der Zellzyklus-Kontrolle und vor allem in der Apoptoseinduktion zugeschrieben. In vielen Zellsystemen war eine Vektor-basierte SIAH-1 Überexpression mit einer Induktion der Apoptose assoziiert.^{99, 131, 132, 179} Eine erhöhte Expression von SIAH-1 konnte in den Spitzen der Darmzotten beobachtet werden, wo nach der Migration der Epithelzellen entlang der

Krypten/Lumen-Achse verstärkt Apoptose induziert wird.^{99, 176} Auch führte die Transfektion von SIAH-1 in U937 (*Human leukemic monocyte lymphoma cell line*) Zellen zu einer gesteigerten Apoptoserate und die Injektion der genetisch modifizierten Zellen in immundefiziente *scid/scid* Mäuse zu einem signifikant verringerten Tumorwachstum.¹³² In einer weiteren Studie konnte eine Interaktion von SIAH-1 und POSH (*plenty of SH3s*) gezeigt werden, welche über die Aktivierung von JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) den programmierten Zelltod induziert.¹⁸⁰ Ebenso führt eine SIAH-2 Überexpression zu einer verstärkten Degradation von TRAF2, inhibierte TNF α induziertes NF κ B und führte ebenfalls zur Aktivierung der JNK-abhängigen Apoptose.¹⁸¹ SIAH-1 wurde aber auch als Apoptose-unabhängiger negativer Regulator des Zellwachstums beschrieben. Die transiente Transfektion von SIAH-1 in HEK (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) Zellen führte zu einem verringerten Zellwachstum, wohingegen keine Induktion der Apoptose detektiert werden konnte.¹³⁰ Diese Daten verdeutlichen, dass eine erhöhte Expression von SIAH-Ligasen zu einer Induktion der Apoptose und Verringerung der Zellproliferation in unterschiedlichen *in vitro* Modellsystemen führt. Die in dieser und anderen Studien nachgewiesene SIAH-1 Reduktion in HCCs kann somit zu einer verminderten Apoptoserate und gesteigerten Proliferation der Tumorzellen beitragen.^{52, 101, 153} Des Weiteren ergeben die gemachten Beobachtungen zusätzliche Aspekte. Eine Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 führte neben einer verringerten Proliferation und einer induzierten Apoptose auch zu einer Verringerung der Migrationsfähigkeit der HCC Zellen. Insbesondere der Einfluss der SIAH-Ligasen auf die Tumorzellmotilität ist kaum untersucht und unterstreicht die zentrale Regulatorfunktion dieser Proteinfamilie auf mehrere tumor-relevante zelluläre Prozesse. Es ist bekannt, dass beschriebene Interaktionspartner von SIAH-1 und SIAH-2 im Migrationsprozess eine Rolle spielen können. So modifiziert z.B. Bag-1 (*BCL2-associated athanogene 1*) in gastrointestinalen Karzinomzelllinien die Migration und Invasion durch HGF-unabhängige Mechanismen.¹²⁸ Erst vor Kurzem konnte nachgewiesen werden, dass SIAH-2 wohl eine zentrale Rolle in der Tumorigenese und Metastasierung von COS-7 (Fibroblasten-Zelllinie; *African green monkey kidney*) und 13.S.1.24 (*olfactory neuronal rat cell line*) Zellen einnimmt. Zum Einen konnte durch die Inhibierung der SIAH-2 Interaktion mit dem Bindepartner PHD3 (*prolyl hydroxylase 3*) und somit der Inhibierung der SIAH-2/PHD3/hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α -Achse, eine reduzierte Metastasierung beobachtet werden.^{182, 183} Darüber hinaus führte die Expression einer dominant-negativen Mutante zu einer erhöhten Spry2 Expression, welches ein Inhibitor des protumorigenen

Ras/Raf-Signalweges darstellt.^{157, 184} Letztendlich belegen die publizierten Daten und eigenen Ergebnisse, dass SIAH-1 oder SIAH-2 in Tumorzellen viele protumorigene Effektormechanismen positiv beeinflussen. Eine Erhöhung der SIAH-Konzentration als auch eine Verringerung der SIAH-Bioaktivität verringert die Tumorwachstums-fördernden- und Motilitäts-Eigenschaften in Tumorzellen.

Eine nukleäre Lokalisation von Ubiquitin-Ligasen ist bereits beschrieben, jedoch ist die Mehrzahl der beschriebenen und untersuchten E3-Ligasen im Zytoplasma lokalisiert, wo sie die Polyubiquitylierung von Substraten und damit den proteasomalen Abbau katalysieren. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass die nukleäre Expression von Ligasen mit wichtigen biologischen Funktionen einhergeht. So haben Ubiquitin-Ligasen z.B. einen funktionellen Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass die SUMO-abhängige Ubiquitin-Ligase Slx5/Slx8 den Nup (nucleoporin)-84-Kernporenkomplex für den proteasomalen Abbau nach DNA-Schädigung (z.B. Doppelstrangbrüche) markiert und dem proteasomalen Abbau zuführt. Durch Degradation des Nup84 Komplexes kommt es zur Induktion von DNA-Reparaturmechanismen und zur Fortführung der Replikation.¹⁸⁵ Des Weiteren haben nukleär lokalisierte Ubiquitin-Ligasen Einfluss auf verschiedenste Entwicklungsprozesse. Die Arbeitsgruppe um Zhang *et al.* konnte ein Homolog von DCAF1 in *Arabidopsis* nachweisen, welches mit dem nukleären CUL4-DDB1-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex interagiert. Der Cullin-RING-E3-Ligase-Komplex (*cullin 4* (CUL4); *regulator of cullins 1* (ROC1)/*RING-Box* (RBX1); *UV-damaged DNA binding protein 1* (DDB1)) wurde im Rahmen des G2-Arrest in *human immunodeficiency virus typ* (HIV)-1 transfizierten Zellen, über die Bindung an DCAF (*DDB1-CUL4 accociated factor*)-1, identifiziert.^{186, 187} Die Autoren konnten zeigen, dass der Interaktionskomplex eine entscheidende Rolle in der Embryogenese oder der Rosettenblätter einnimmt.¹⁸⁸

Darüber hinaus sind Ubiquitin-Ligasen für den subzellulären Transport von Proteinen und bei der DNA-Replikation von zentraler Bedeutung. So konnte für den CUL4-DDB1-Komplex nachgewiesen werden, dass er zu Beginn der S-Phase direkt an den „*replication licensing factors*“ CDT (*chromatin licensing and DNA replication factor*)-1 bindet und diesen für den proteasomalen Abbau markiert. Darüber hinaus stimuliert der Komplex, über die negative Regulation des CDK-Inhibitors CKI (*casein kinase*)-1, indirekt den nukleären Export vom „*replication licensing factors*“ CDC6 (*cell division cycle 6*). Die beiden Signalwege wirken

redundant und führen zur verstärkten DNA-Rereplikation.¹⁸⁹

Auch für SIAH-1 konnte solch ein subzellulärer Transportmechanismus beschrieben werden. SIAH-1 bindet S-nitrolysiertes GAPDH und kolokalisiert mit diesem unter Zuhilfenahme der SIAH-NLS in den Zellkern.^{155, 156, 190} SIAH-1 wird durch GAPDH stabilisiert und ist in der Lage den proteasomalen Abbau von nukleären Substraten (z.B. N-CoR; *nuclear receptor corepressor*) zu induzieren.¹⁷³ Jedoch kommt auch im Kern die Polyubiquitylierung und der sich anschließende proteasomale Abbau von Zielproteinen eine zentrale Rolle zu. Studien belegen, dass alle Funktions-relevanten Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert vorliegen.^{191, 192} Die subzelluläre Lokalisation des Proteasoms hängt stark vom Zelltyp oder den Wachstumsbedingungen ab, wodurch die Menge von zytoplasmatischem versus nukleärem Proteasom von 17-50% variieren kann.¹⁹³ Sowohl das zytoplasmatische als auch das nukleäre Ubiquitin-Proteasom-System weisen einen ähnlichen Aufbau auf; tatsächlich besitzen verschiedenste Komponenten des 20s Proteasoms eine NLS, was den effizienten Transfer in den Kern ermöglicht.¹⁹⁴ Zu diesen in beiden zellulären Kompartimenten vorkommenden Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems gehören Ubiquitin, die regulatorische Untereinheit PA28 (*Proteasome activator 28*), der 19S Regulatorkomplex, der Proteasomaktivator Bln10 oder die Ubiquitin-spezifische Protease HAUSP (*Herpes virus-associated ubiquitin-specific protease*).¹⁹⁵⁻¹⁹⁹ Jedoch weist das nukleäre Ubiquitin-Proteasom-System auch spezifische strukturelle Charakteristika und ein differentielles Subtypenmuster auf, welches sich z.B. durch einen erhöhten Anteil an beta1i und beta5i im Vergleich zum zytoplasmatischen Ubiquitin-Proteasom-System auszeichnet.²⁰⁰ Die Unterschiede im Aufbau der Proteasom-Systeme bedingen auch funktionelle Eigenschaften, welche maßgeblich auf einem charakteristischen Zielproteinprofil beruhen.

Welche der aufgezählten Funktionen letztendlich im HCC von Relevanz sind, konnte bisher nicht geklärt werden. Für beide SIAH-Ligasen ist die nukleäre Akkumulation anscheinend von besonderer Bedeutung, da sie einen Wachstumsvorteil für die HCC Zellen darstellt. Die nukleäre Akkumulation korreliert mit der Tumordifferenzierung und die Inhibierung von SIAH-1 und SIAH-2 reduziert alle getesteten biologischen und tumor-relevanten Prozesse. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Regulation von FBP-1 und FBP-3, welche z.T. die protumorigenen Effekte der SIAH-Ligasen vermitteln, über den proteasomalen Abbau eines (noch) unbekannten Faktors reguliert wird (siehe 4.3).

Für die nukleäre Akkumulation beider Ubiquitin-Ligasen konnten die gleichen funktionellen Auswirkungen (erhöhte Proliferation und Migration, verringerte Apoptose) festgestellt werden, obwohl keine komplette funktionelle Redundanz für SIAH-1 und SIAH-2 wahrscheinlich ist. Auch wenn beide SIAH-Ligasen unabhängig voneinander identische onkogene Effekte in HCC Zellen induzieren, spricht für ihre funktionelle Unabhängigkeit, dass die nukleäre Akkumulation beider Ligasen nur moderat und invers miteinander in HCCs korreliert. Des Weiteren weisen SIAH-1 als auch SIAH-2 sowohl redundante, aber auch exklusive beschriebene Substrate auf, über die sie ihre (gleichartigen) biologischen Eigenschaften vermitteln.¹¹⁰ Insbesondere der letzte Punkt wird durch eigene Analysen bestätigt, bei denen eine exklusive molekulare Zuordnung von nukleärem SIAH-1 zu FBP-3 und SIAH-2 zu FBP-1 existiert, welche die Bioverfügbarkeit der FBPs maßgeblich beeinflusst (siehe 4.3).

4.3 Vermittlung der protumorigenen Eigenschaften der Ubiquitin-Ligasen SIAH-1 und SIAH-2

Für SIAH-1 und SIAH-2 wurden bereits eine Vielzahl von Zielproteinen beschrieben, welche durch Polyubiquitylierung für den proteasomalen Abbau markiert werden.¹¹⁰ Neben der Markierung für die Degradation sind aber auch Substrate bekannt, die durch Monoubiquitylierung funktionell modifiziert werden, wie es auch für Modifikationen durch Methyl-, Acetyl- oder Phosphatreste beschrieben wurde.²⁰¹ Unter den SIAH-Bindepartnern, welche als Zielproteine ubiquitiniert und proteasomal abgebaut werden, befinden sich verschiedenste Proteinklassen, welche Einfluss auf die unterschiedlichsten zellulären Prozesse nehmen (Abb. 33). Über das konservierte Bindemotiv (PxAxVxP),²⁰² binden SIAH-1 und SIAH-2 an Membranproteine, wie DCC (*deleted in colorectal cancer*/Netrin-Rezeptor), das in die Apoptoseregulation eingebunden ist,¹¹¹ das Chromokinesin Kid,¹²⁵ ein Mikrotubulus-/DNA-interagierendes Protein, das die Chromosomensegregation im Prozess der Mitose stimuliert/induziert,¹⁷⁵ und den Transkriptionscoaktivator BOB-1/OBF-1 (*OCT-binding factor-1*).^{203, 204} Auch der transkriptionelle Coaktivator β -Catenin wird durch SIAH-1 phosphorylierungs-unabhängig für den proteasomalen Abbau markiert.^{100, 109} Das Bindeprotein TIEG-1 ist ein Repressor der Transkription und stimuliert den Wachstumsfaktor *transforming growth factor beta* (TGF β) wodurch mitochondrial-vermittelte Apoptose induziert wird.^{205, 206} Darüber hinaus wurden direkte Interaktionen zwischen den SIAH-Ligasen und T-Star

(*testis-signal transduction and activation of RNA*), einem RNA-bindenden Protein, welches bereits in mehreren Tumorentitäten als Regulator der Telomeraseaktivität und der Signaltransduktion beschrieben wurde und Bag-1 (*BCL2-associated athanogene 1*), einem Inhibitor des programmierten Zelltods beschrieben.²⁰⁷⁻²¹¹

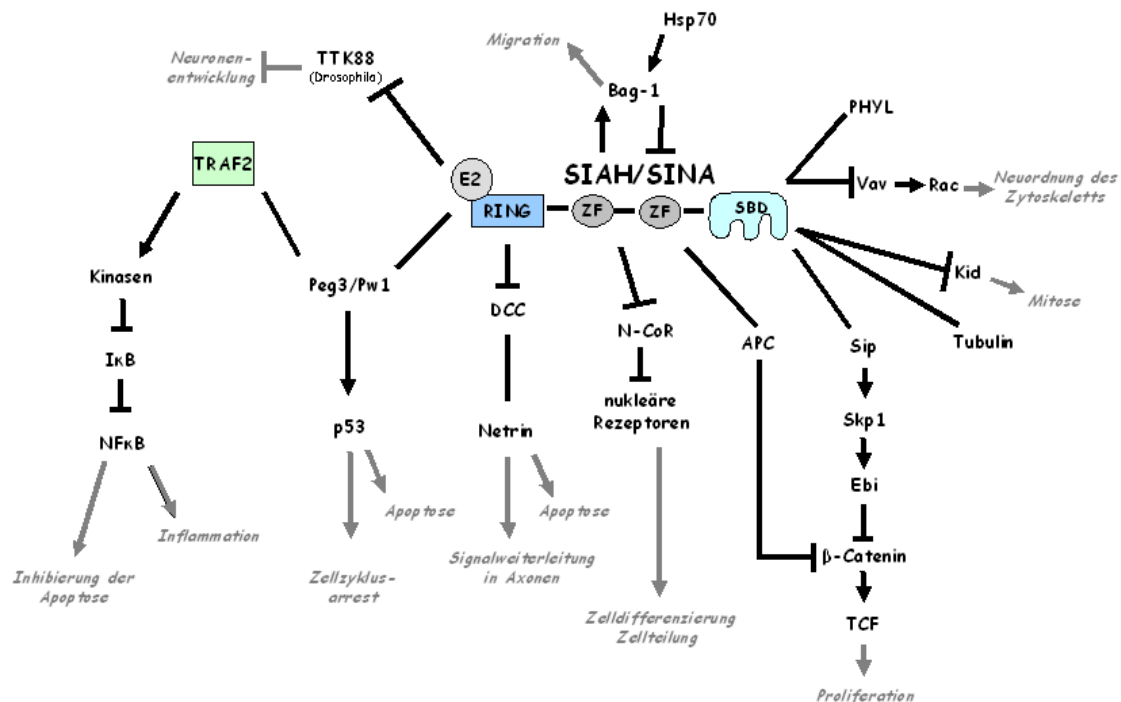


Abbildung 33: Schematische Übersicht bekannter SIAH-Substrate und deren biologische Effekte

Das SINA Protein aus *Drosophila* und die beiden humanen Homologe SIAH-1 und SIAH-2 regulieren die Polyubiquitylierung und anschließende proteasomale Degradation von verschiedensten Proteinen, welche in Apoptose, Proliferation, Migration und Zelldifferenzierung involviert sind.^{109, 212} Die SIAH-Familienproteine sind für die Degradation von DCC,¹¹¹ N-CoR,¹¹² β-Catenin,^{100, 109} Kid,¹²⁵ oder Bag-1 verantwortlich.^{128, 130} Sie binden den *guanine nucleotide exchange factor* Vav,²¹³ sowie das Zinkfinger-Protein Peg3/Pw1.^{179, 214} (Abbildung nach Reed und Ely, 2002, Nature Structural Biology; Auswahl von Signalwegen)

Alle im Rahmen dieser Arbeit in HCC Zellen untersuchten Substrate (T-Star, Bag-1 und β-Catenin) wurden jedoch nach der effizienten Einzel- als auch Doppelinhibierung beider Ligasen nicht in ihrer Konzentration reguliert. Diese Diskrepanzen zur Literatur können auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein. Zum Einen könnten Organ- und Zelltypspezifitäten auf molekularer Ebene vorliegen, welche die differentielle Regulation der Substrate in unterschiedlichen *in vitro* Modellsystemen durch die SIAH-Ligasen erklärt. Zum Anderen könnten die Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation der SIAH-

Proteine von Bedeutung sein. In den untersuchten HCC Zelllinien sind SIAH-1 und SIAH-2 vor allem nukleär lokalisiert. Ob dies auch bei den anderen Zelllinien der verschiedenen Tumorentitäten der Fall ist, wurde bisher nicht vergleichend analysiert. Da jedoch bekannt ist, dass die differentielle subzelluläre Lokalisation von E3-Ligasen auch mit der Veränderung des Substratspektrums einhergeht, mag dies der Grund für die beobachtete Substratdivergenz sein.

Basierend auf *Yeast-two-hybrid* Analysen wurde FIR (*FBP-interacting-repressor*, Synonym: *SIAH-binding protein-1*) als potentieller Interaktionspartner für SIAH-1 beschrieben. Diese Interaktion zwischen Ubiquitin-Ligasen und FIR hätte einen direkten Zusammenhang zwischen der nukleären Akkumulation von SIAH-1 und SIAH-2 und potentiellen pro-tumorigenen Funktionen von FIR vermuten lassen.^{215, 216} FIR ist ein DNA- und RNA-bindendes Protein, welches in verschiedene zelluläre Prozesse, wie pre-mRNA Splicing, der Induktion von Apoptose und transkriptioneller Regulation involviert ist.²¹⁶⁻²¹⁸ In den hier durchgeführten Untersuchungen konnten aber keine Effekte auf die Bioverfügbarkeit von FIR nach SIAH-Inhibierung beobachtet werden. Da FIR auch als Repressor der FBP-Transkriptionsfaktorfamilie beschrieben wurde und somit eine mechanistische Verbindung der SIAH-Proteine auf die Bioverfügbarkeit der FBP-Proteinfamilie darstellen könnte, wurden auch die Mitglieder der FBP-Familie nach Inhibierung von SIAH-1 und/oder SIAH-2 untersucht. Tatsächlich konnte eine Reduktion der FBP-Expression nach Inhibierung und eine signifikante Korrelation zwischen der nukleären Akkumulation von FBP-3 und SIAH-1 als auch FBP-1 und SIAH-2 in HCCs beobachtet werden.

Die FBP-Familienmitglieder sind multifunktionale Faktoren, die u.a. in die mRNA Prozessierung involviert sind.^{219, 220} Beruhend auf ihrer Fähigkeit, die *cis*-Elemente einzelsträngiger DNA zu erkennen, fungieren FBP-Proteine auch als Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf die Zelldifferenzierung.²²¹ Sie wurden als Mitglieder eines ternären Komplexes mit FIR und FUSE (*far upstream sequence element*) beschrieben, der als sogenannter Mechanosensor die transkriptionelle Regulation der Expression von c-MYC unter physiologischen Bedingungen reguliert.^{222, 223} Darüber konnten Arbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe (AG Molekulare Hepatopathologie) zeigen, dass im HCC eine Überexpression von FBP-1 in 70% der HCCs vorliegt, was mit einer erhöhten Expression des mikrotubulus-destabilisierenden Proteins Stathmin (Oncoprotein 18) assoziiert ist und so Tumorzellproliferation und Migration induziert (M. Malz, persönliche

Kommunikation).¹²⁴ Auch für FBP-3 konnte in 60% der HCCs eine Überexpression nachgewiesen werden. Funktionelle Untersuchungen belegen, dass hohe FBP-3 Konzentrationen zur Proliferationsinduktion in HCC-Zellen führt, aber nicht motilitätssteigernd ist (M. Malz, persönliche Kommunikation).

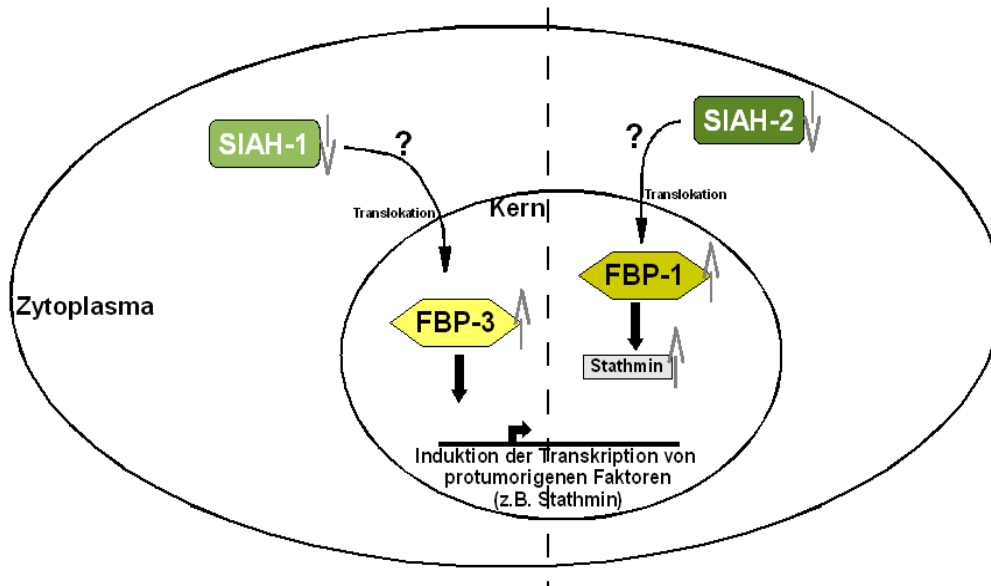


Abbildung 34: Schematische Darstellung des potentiellen SIAH-FBP-Signalweges in HCC Zellen

Möglicher Einfluss der SIAH-Proteine auf die FBP-Familienmitglieder FBP-1 und FBP-3 und die damit verbundene Expressioninduktion von protumorigenen Faktoren, wie z.B. Stathmin. Die inverse und negative Korrelation verdeutlicht, dass beide Ereignisse selten stattfinden (gestrichelte Linie: zwei Mechanismen, zwei Ereignisse)

Überraschenderweise war eine positive Korrelation zwischen der nukleären Akkumulation der SIAH-Moleküle und der Überexpression von FBP-3 zu beobachten. Dies verdeutlicht, dass die Regulation der FBP-Bioverfügbarkeit nicht über eine SIAH-abhängige Polyubiquitylierung mit anschließender proteasomaler Degradation erfolgte. Da eine Regulation der FBPs auf mRNA- und Proteinebene festgestellt werden konnte, ist vielmehr von einem indirekten Regulationsmechanismus zwischen beiden Proteinfamilien auszugehen. Ein denkbarer Mechanismus stellt z.B. die SIAH-abhängige Degradation eines transkriptionellen Inhibitors dar, welcher direkt die Expression von FBPs moduliert. Dies wird durch die Effekte des Proteasominhibitor MG132 unterstützt, der zu einer Reduktion von FBP-1 und FBP-3 führt. Die SIAH-Ligasen würden demnach als negative Regulatoren auf einen oder mehrere unbekannte Faktoren wirken, welche wiederum Einfluss auf die FBP-1 und/oder FBP-3 Bioverfügbarkeit haben (Abb. 34). Da hier eine sehr spezifische

Einflussnahme vorliegt (SIAH-1 reguliert FBP-3; SIAH-2 reguliert FBP-1), ist davon auszugehen, dass es sich hier um zwei unabhängige Mechanismen handelt, welche ggf. durch zwei spezifische Faktoren vermittelt werden. Ob der Interaktionspartner FIR eine Rolle bei der Regulation der FBP-Expression über den SIAH-Signalweg spielt, ist bisher nicht geklärt. FIR könnte in den Ligase-Komplex eingebunden sein, ohne einer proteasomalen Degradation zu unterliegen, wird aber für die Vermittlung der Ligasefunktion und damit der Regulation der FBPs benötigt. Dadurch wurden die Ergebnisse der *Yeast-two-hybrid* Analysen erklärt; FIR ist ein Interaktionspartner von SIAH-1, unterliegt durch die Bindung aber keinem proteasomalen Abbau. Da nachweislich eine Interaktion von FIR und FBP-1 besteht, wäre auch die Notwendigkeit dieser Interaktion eine mögliche Erklärung für die indirekte Erhöhung der FBP-1-Bioverfügbarkeit.

4.4 Die Ubiquitin-Ligasen SIAH-1 und SIAH-2 als therapeutische Zielstrukturen

Das Ubiquitin-Proteasom-System stellt bereits eine zentrale Zielstruktur bei der Behandlung von Tumorerkrankungen dar. Mit niedermolekularen Proteasominhibitoren, welche bereits bei humanen Malignomen zum Einsatz kommen oder in klinischen Studien sind, kann die Aktivität des Proteasoms beeinflusst werden.²²⁴ Der bekannteste und erste zugelassene Proteasominhibitor ist Bortezomib/Velcade, welches bei der Therapie des multiplen Myeloms zum Einsatz kommt.^{225, 226} Inzwischen wird die Wirksamkeit der Substanz auch bei andere Tumorentitäten untersucht, wie dem Lungenkarzinom, Prostatakarzinom oder non-Hodgkin-Lymphom.²²⁷⁻²³⁰ Andere vielversprechende Inhibitoren, welche zur Zeit näher untersucht werden, sind z.B. Carfilzomib oder Lactacystin.²³¹⁻²³³ Carfilzomib ist ein Epoxomicin verwandter Proteasominhibitor, der durch die Bindung das Chymotrypsin-ähnliche Proteasom inhibiert.^{231, 232} Lactacystin ist eine Substanz, die aus *Streptomyces* isoliert werden konnte und als potenter Proteasominhibitor beschrieben wurde.²³³

Neben den selektiven Proteasominhibitoren, welche durch ihre Wirkung den kompletten proteasomalen Abbau inhibieren, gibt es Studien zu Substanzen mit anderen Spezifitäten. Ein Beispiel ist die Inhibierung des Ubiquitin-Aktivierungsenzyms (E1) durch PYR-41. Diese Substanz ist ein Pyrazonderivat, das die Ausbildung der E1-Ubiquitin-Thioesterbindung unterdrückt und der Anreicherung von Protein-Ubiquitin-Konjugaten vorbeugt.²³⁴ Einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt stellt die spezifische Inhibierung von

Ubiquitin-Ligasen dar.²³⁵ So wurden für die Ubiquitin-Ligase MDM2 bereits Inhibitoren in vorklinischen Studien, wie z.B. der „*small-molecule*“-Inhibitor RITA (*reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis*), untersucht.^{118, 152, 236, 237} Es konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor RITA die Interaktion zwischen p53 und MDM2 unterbindet, wodurch es zu einer Akkumulation von p53 und zur Induktion von Apoptose kommt.²³⁸

Die therapeutische Relevanz der selektiven SIAH-Inhibierung bei der Behandlung des HCC wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt: die SIAH-Inhibierung führt zu einer verstärkten Sensibilisierung der HCC-Zellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika. Besonders Vinblastin, ein Vincaalkaloid, welches die Mikrotubuluspolymerisation hemmt zeigte deutliche Effekte hinsichtlich der Reduktion der Tumorzellvitalität. Die kombinierte Behandlung (Inhibierung SIAH und Vinblastin) führte zu einer Gesamtreduktion der Tumorzellvitalität um 96%. Die beiden SIAH-Ubiquitin-Ligasen könnten demnach eine neue, mögliche therapeutische Zielstruktur darstellen. Daher könnte die Entwicklung von hoch selektiven Inhibitoren, welche an SIAH-1 und/oder SIAH-2 binden, einen neuen therapeutischen Ansatz für die Behandlung des HCC darstellen.

5. Literaturverzeichnis

1. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. Pathologie. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 2008.
2. Strumberg D. Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. *Drugs Today* 2005;41:773-784.
3. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: An epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol* 2002;35:S72-78.
4. Di Bisceglie AM, Rustgi VK, Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Lotze MT. NIH conference. Hepatocellular carcinoma. *Ann Intern Med* 1988;108:390-401.
5. Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002;21:2593-2604.
6. Beasley RP, Hwang LY. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 1984;4:113-121.
7. Chen CJ, Yu MW, Liaw YF. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:S294-308.
8. Di Bisceglie AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;26:34S-38S.
9. El-Serag HB, Mason AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med* 2000;160:3227-3230.
10. Kubicka S, Rudolph KL, Hanke M, Tietze MK, Tillmann HL, Trautwein C, et al. Hepatocellular carcinoma in Germany: A retrospective epidemiological study from a low-endemic area. *Liver* 2000;20:312-318.
11. Deuffic S, Poynard T, Buffat L, Valleron AJ. Trends in primary liver cancer. *Lancet* 1998;351:214-215.
12. Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Shuda M, Tanaka K, Arai M, et al. Genetic and epigenetic events in human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 2001;18:1271-1278.
13. Taylor-Robinson SD, Foster GR, Arora S, Hargreaves S, Thomas HC. Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-94. *Lancet* 1997;350:1142-1143.
14. Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32:225-237.
15. Blum HE. Hepatocellular carcinoma: Therapy and prevention. *World J Gastroenterol* 2005;11:7391-7400.
16. Kern MA, Breuhahn K, Schirmacher P. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Adv Cancer Res* 2002;86:67-112.
17. International working party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology* 1995;22:983-993.
18. Kondo Y. Pathology of early hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions in the liver. *Liver cancer* (K. Okud and E. Tabor, Eds.) New York, Churchill Livingstone 1997;135-154.
19. Durr R, Caselmann WH. Carcinogenesis of primary liver malignancies. *Langenbecks Arch Surg* 2000;385:154-161.
20. Hirohashi S, Ishak KG, Kojiro M, Wanless IR, Theise ND, Tsukuma H, Blum HE,

- Deugnier Y, Laurent Puig P, Fischer HP and Sakamoto M. Hepatocellular carcinoma. In "Pathology&Genetics. Tumors of the digestive system" (S.T. Hamilton and L.A. Aaltonen, Eds.) WHO, Geneva 2000;159-180.
21. Moinzadeh P, Breuhahn K, Stutzer H, Schirmacher P. Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade--results of an explorative CGH meta-analysis. *Br J Cancer* 2005;92:935-941.
 22. Schlaeger C, Longerich T, Schiller C, Bewerunge P, Mehrabi A, Toedt G, et al. Etiology-dependent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2008;47:511-520.
 23. Zondervan PE, Wink J, Alers JC, JN IJ, Schalm SW, de Man RA, et al. Molecular cytogenetic evaluation of virus-associated and non-viral hepatocellular carcinoma: Analysis of 26 carcinomas and 12 concurrent dysplasias. *J Pathol* 2000;192:207-215.
 24. Qin LX, Tang ZY, Sham JS, Ma ZC, Ye SL, Zhou XD, et al. The association of chromosome 8p deletion and tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:5662-5665.
 25. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331.
 26. Sheikh MS, Fornace AJ, Jr. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 2000;182:171-181.
 27. Nishida N, Fukuda Y, Kokuryu H, Toguchida J, Yandell DW, Ikenaga M, et al. Role and mutational heterogeneity of the p53 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:368-372.
 28. Feitelson MA. Hepatitis B x antigen and p53 in the development of hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998;5:367-374.
 29. Thomas M, Matlashewski G, Pim D, Banks L. Induction of apoptosis by p53 is independent of its oligomeric state and can be abolished by HPV-18 E6 through ubiquitin mediated degradation. *Oncogene* 1996;13:265-273.
 30. Hayashi H, Sugio K, Matsumata T, Adachi E, Takenaka K, Sugimachi K. The clinical significance of p53 gene mutation in hepatocellular carcinomas from Japan. *Hepatology* 1995;22:1702-1707.
 31. Itoh T, Shiro T, Seki T, Nakagawa T, Wakabayashi M, Inoue K, et al. Relationship between p53 overexpression and the proliferative activity in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2000;6:137-142.
 32. Qiu SJ, Ye SL, Wu ZQ, Tang ZY, Liu YK. The expression of the mdm2 gene may be related to the aberration of the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124:253-258.
 33. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986;323:643-646.
 34. Zhang X, Xu HJ, Murakami Y, Sachse R, Yashima K, Hirohashi S, et al. Deletions of

- chromosome 13q, mutations in retinoblastoma 1, and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:4177-4182.
35. Chen TC, Hsieh LL, Kuo TT, Ng KF, Wu Chou YH, Jeng LB, et al. p16INK4 gene mutation and allelic loss of chromosome 9p21-22 in Taiwanese hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2000;20:1621-1626.
 36. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: A novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:411-417.
 37. Fosslien E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000;37:431-502.
 38. Kern MA, Schubert D, Sahi D, Schoneweiss MM, Moll I, Haugg AM, et al. Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells. *Hepatology* 2002;36:885-894.
 39. Bae SH, Jung ES, Park YM, Kim BS, Kim BK, Kim DG, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a COX-2 inhibitor, NS-398. *Clin Cancer Res* 2001;7:1410-1418.
 40. Niketeghad F, Decker HJ, Caselmann WH, Lund P, Geissler F, Dienes HP, et al. Frequent genomic imbalances suggest commonly altered tumour genes in human hepatocarcinogenesis. *Br J Cancer* 2001;85:697-704.
 41. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of WNT signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:59-88.
 42. Buendia MA. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2000;10:185-200.
 43. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303:1483-1487.
 44. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-456.
 45. Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, Lai PL, Peng SY. Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol* 2000;157:763-770.
 46. Nhieu JT, Renard CA, Wei Y, Cherqui D, Zafrani ES, Buendia MA. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J Pathol* 1999;155:703-710.
 47. Prange W, Breuhahn K, Fischer F, Zilkens C, Pietsch T, Petmecky K, et al. Beta-catenin accumulation in the progression of human hepatocarcinogenesis correlates with loss of E-cadherin and accumulation of p53, but not with expression of conventional WNT-1 target genes. *J Pathol* 2003;201:250-259.
 48. Wong CM, Fan ST, Ng IO. Beta-catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: Clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer* 2001;92:136-145.
 49. Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, et al. Mutational

- spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* 2002;21:4863-4871.
50. Lin SB, Hsieh SH, Hsu HL, Lai MY, Kan LS, Au LC. Antisense oligodeoxynucleotides of IGF-II selectively inhibit growth of human hepatoma cells overproducing IGF-II. *J Biochem (Tokyo)* 1997;122:717-722.
 51. Aihara T, Noguchi S, Sasaki Y, Nakano H, Monden M, Imaoka S. Clonal analysis of precancerous lesion of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1996;111:455-461.
 52. Breuhahn K, Vreden S, Haddad R, Beckebaum S, Stippel D, Flemming P, et al. Molecular profiling of human hepatocellular carcinoma defines mutually exclusive interferon regulation and insulin-like growth factor II overexpression. *Cancer Res* 2004;64:6058-6064.
 53. Cariani E, Lasserre C, Seurin D, Hamelin B, Kemeny F, Franco D, et al. Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. *Cancer Res* 1988;48:6844-6849.
 54. Sohda T, Yun K, Iwata K, Soejima H, Okumura M. Increased expression of insulin-like growth factor 2 in hepatocellular carcinoma is primarily regulated at the transcriptional level. *Lab Invest* 1996;75:307-311.
 55. Uchida K, Kondo M, Takeda S, Osada H, Takahashi T, Nakao A. Altered transcriptional regulation of the insulin-like growth factor 2 gene in human hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 1997;18:193-198.
 56. Takeda S, Kondo M, Kumada T, Koshikawa T, Ueda R, Nishio M, et al. Allelic-expression imbalance of the insulin-like growth factor 2 gene in hepatocellular carcinoma and underlying disease. *Oncogene* 1996;12:1589-1592.
 57. Aihara T, Noguchi S, Miyoshi Y, Nakano H, Sasaki Y, Nakamura Y, et al. Allelic imbalance of insulin-like growth factor II gene expression in cancerous and precancerous lesions of the liver. *Hepatology* 1998;28:86-89.
 58. Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:159-180.
 59. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:425-479.
 60. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695:55-72.
 61. Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* 2005;24:3353-3359.
 62. Schlesinger DH, Goldstein G, Niall HD. The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* 1975;14:2214-2218.
 63. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 1992;61:761-807.
 64. Hershko A. Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* 1996;21:445-449.

65. Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* 1992;26:179-207.
66. Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* 1997;11:1245-1256.
67. Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 1999;274:3363-3371.
68. Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998;92:367-380.
69. Naujokat C, Hoffmann S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 2002;82:965-980.
70. Bach I, Ostendorff HP. Orchestrating nuclear functions: Ubiquitin sets the rhythm. *Trends Biochem Sci* 2003;28:189-195.
71. Busch H, Goldknopf IL. Ubiquitin - protein conjugates. *Mol Cell Biochem* 1981;40:173-187.
72. Spencer VA, Davie JR. Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* 1999;240:1-12.
73. Robzyk K, Recht J, Osley MA. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* 2000;287:501-504.
74. Salghetti SE, Caudy AA, Chenoweth JG, Tansey WP. Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* 2001;293:1651-1653.
75. Cramer P, Muller CW. A firm hand on NFkappaB: Structures of the IkappaBalpha-NFkappaB complex. *Structure* 1999;7:R1-6.
76. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2:301-310.
77. Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF-kappaB: Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:M55-62.
78. Zhang PL, Pellitteri PK, Law A, Gilroy PA, Wood GC, Kennedy TL, et al. Overexpression of phosphorylated nuclear factor-kappa B in tonsillar squamous cell carcinoma and high-grade dysplasia is associated with poor prognosis. *Mod Pathol* 2005;18:924-932.
79. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 1997;420:25-27.
80. Ruffner H, Joazeiro CA, Hemmati D, Hunter T, Verma IM. Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: Loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5134-5139.
81. Honda R, Yasuda H. Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 2000;19:1473-1476.
82. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53.

- Nature 1997;387:296-299.
83. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 1998;26:3453-3459.
 84. Ries S, Biederer C, Woods D, Shifman O, Shirasawa S, Sasazuki T, et al. Opposing effects of Ras on p53: Transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* 2000;103:321-330.
 85. Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, et al. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* 2001;276:14537-14540.
 86. Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11364-11369.
 87. Chen A, Kleiman FE, Manley JL, Ouchi T, Pan ZQ. Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2002;277:22085-22092.
 88. D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 2003;3:23-34.
 89. Dawson SP. Hepatocellular carcinoma and the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 2008.
 90. Fu XY, Wang HY, Tan L, Liu SQ, Cao HF, Wu MC. Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:638-643.
 91. Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, Dawson S, Nonoguchi K, Kido T, et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med* 2000;6:96-99.
 92. Dawson S, Apcher S, Mee M, Higashitsuji H, Baker R, Uhle S, et al. Gankyrin is an ankyrin-repeat oncoprotein that interacts with CDK4 kinase and the S6 ATPase of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 2002;277:10893-10902.
 93. Mahajan A, Guo Y, Yuan C, Weghorst CM, Tsai MD, Li J. Dissection of protein-protein interaction and CDK4 inhibition in the oncogenic versus tumor suppressing functions of gankyrin and P16. *J Mol Biol* 2007;373:990-1005.
 94. Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Nagao T, Sumitomo Y, et al. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. *Cancer Cell* 2005;8:75-87.
 95. Farrer MJ. Genetics of parkinson disease: Paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 2006;7:306-318.
 96. Denison SR, Wang F, Becker NA, Schule B, Kock N, Phillips LA, et al. Alterations in the common fragile site gene Parkin in ovarian and other cancers. *Oncogene* 2003;22:8370-8378.
 97. Wang F, Denison S, Lai JP, Philips LA, Montoya D, Kock N, et al. Parkin gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:85-96.

98. Staropoli JF, McDermott C, Martinat C, Schulman B, Demireva E, Abeliovich A. Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* 2003;37:735-749.
99. Nemani M, Linares-Cruz G, Bruzzoni-Giovanelli H, Roperch JP, Tuynder M, Bougueleret L, et al. Activation of the human homologue of the drosophila sina gene in apoptosis and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9039-9042.
100. Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, et al. Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell* 2001;7:927-936.
101. Matsuo K, Satoh S, Okabe H, Nomura A, Maeda T, Yamaoka Y, et al. Siah1 inactivation correlates with tumor progression in hepatocellular carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:283-291.
102. Chen C, Seth AK, Aplin AE. Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer. *Mol Cancer Res* 2006;4:695-707.
103. Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: Multiple players in cancer development. *Cancer Cell* 2008;14:10-21.
104. Carthew RW, Rubin GM. Seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the drosophila eye. *Cell* 1990;63:561-577.
105. Fortini ME, Simon MA, Rubin GM. Signalling by the sevenless protein tyrosine kinase is mimicked by Ras1 activation. *Nature* 1992;355:559-561.
106. Gaul U, Mardon G, Rubin GM. A putative Ras GTPase activating protein acts as a negative regulator of signaling by the Sevenless receptor tyrosine kinase. *Cell* 1992;68:1007-1019.
107. Ro H, Jang Y, Rhee M. The RING domain of Siaz, the zebrafish homologue of Drosophila seven in absentia, is essential for cellular growth arrest. *Mol Cells* 2004;17:160-165.
108. Hu G, Chung YL, Glover T, Valentine V, Look AT, Fearon ER. Characterization of human homologs of the Drosophila seven in absentia (sina) gene. *Genomics* 1997;46:103-111.
109. Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 2001;7:915-926.
110. Brauckhoff A, Ehemann V, Schirmacher P, Breuhahn K. Reduzierte Expression der E3-Ubiquitin Ligase *seven in absentia homologue* (SIAH)-1 in Zellen des humanen hepatozellulären Karzinoms. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2007;91:269-277.
111. Hu G, Zhang S, Vidal M, Baer JL, Xu T, Fearon ER. Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1997;11:2701-2714.
112. Zhang J, Guenther MG, Carthew RW, Lazar MA. Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev* 1998;12:1775-1780.
113. Tanikawa J, Ichikawa-Iwata E, Kanei-Ishii C, Nakai A, Matsuzawa S, Reed JC, et al.

- p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J Biol Chem* 2000;275:15578-15585.
114. Matsuzawa S, Takayama S, Froesch BA, Zapata JM, Reed JC. p53-inducible human homologue of *Drosophila* seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: Suppression by BAG-1. *EMBO J* 1998;17:2736-2747.
115. Germani A, Prabel A, Mourah S, Podgorniak MP, Di Carlo A, Ehrlich R, et al. Siah-1 interacts with CtiP and promotes its degradation by the proteasome pathway. *Oncogene* 2003;22:8845-8851.
116. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnology* 2004;22:326-330.
117. Friedman SL, Shaulian E, Littlewood T, Resnitzky D, Oren M. Resistance to p53-mediated growth arrest and apoptosis in Hep 3B hepatoma cells. *Oncogene* 1997;15:63-70.
118. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303:844-848.
119. Lukasiak S, Breuhahn K, Schiller C, Schmidtke G, Groettrup M. Quantitative analysis of gene expression relative to 18S rRNA in carcinoma samples using the LightCycler instrument and a SYBR GreenI-based assay: Determining FAT10 mRNA levels in hepatocellular carcinoma. *Methods Mol Biol* 2008;429:59-72.
120. Gao Q, Wang XY, Fan J, Qiu SJ, Zhou J, Shi YH, et al. Selection of reference genes for real-time PCR in human hepatocellular carcinoma tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:979-986.
121. Ewens WJ, Spielman RS. Locating genes by linkage and association. *Theor Popul Biol* 2001;60:135-139.
122. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 1986;159:109-113.
123. Nussbaum T, Vreden S, Farsad M, Schirmacher P, Breuhahn K. Insulin-like growth factor (IGF)-II in der humanen Hepatokarzinogenese – eine potentielle therapeutische Zielstruktur? *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2005;79:55-60.
124. Singer S, Ehemann V, Brauckhoff A, Keith M, Vreden S, Schirmacher P, et al. Protumorigenic overexpression of stathmin/Op18 by gain-of-function mutation in p53 in human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2007;46:759-768.
125. Germani A, Bruzzoni-Giovanelli H, Fellous A, Gisselbrecht S, Varin-Blank N, Calvo F. Siah-1 interacts with alpha-tubulin and degrades the kinesin Kid by the proteasome pathway during mitosis. *Oncogene* 2000;19:5997-6006.
126. Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001;107:309-321.
127. Tschaharganeh D, Ehemann V, Nussbaum T, Schirmacher P, Breuhahn K. Non-specific effects of siRNAs on tumor cells with implications on therapeutic applicability using RNA interference. *Pathol Oncol Res* 2007;13:84-90.

128. Naishiro Y, Adachi M, Okuda H, Yawata A, Mitaka T, Takayama S, et al. BAG-1 accelerates cell motility of human gastric cancer cells. *Oncogene* 1999;18:3244-3251.
129. Linares-Cruz G, Bruzzoni-Giovanelli H, Alvaro V, Roperch JP, Tuynder M, Schoevaert D, et al. p21WAF-1 reorganizes the nucleus in tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1131-1135.
130. Matsuzawa S, Takayama S, Froesch BA, Zapata JM, Reed JC. p53-inducible human homologue of Drosophila seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: Suppression by BAG-1. *EMBO J* 1998;17:2736-2747.
131. Amson RB, Nemani M, Roperch JP, Israeli D, Bougueleret L, Le Gall I, et al. Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: Activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3953-3957.
132. Roperch JP, Lethrone F, Prieur S, Piouffre L, Israeli D, Tuynder M, et al. SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: Identification of common effectors with p53 and p21(Waf1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8070-8073.
133. Chan SK, Gullick WJ, Hill ME. Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer -- search and destroy. *Eur J Cancer* 2006;42:17-23.
134. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1659-1672.
135. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-580.
136. Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, et al. Kit extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;156:791-795.
137. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-1027.
138. Kluger HM, Siddiqui SF, Angeletti C, Sznol M, Kelly WK, Molinaro AM, et al. Classification of renal cell carcinoma based on expression of VEGF and VEGF receptors in both tumor cells and endothelial cells. *Lab Invest* 2008;88:962-972.
139. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.
140. Spigel DR, Burstein HJ. Trastuzumab regimens for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2003;4:329-337; discussion 338-329.
141. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990;247:824-830.

142. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-1037.
143. Ziegler DS, Wright RD, Kesari S, Lemieux ME, Tran MA, Jain M, et al. Resistance of human glioblastoma multiforme cells to growth factor inhibitors is overcome by blockade of inhibitor of apoptosis proteins. *J Clin Invest* 2008;118:3109-3122.
144. van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, Donato di Paola E, Dimitrijevic S, et al. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: A phase I study. *Lancet* 2001;358:1421-1423.
145. Clark JW, Eder JP, Ryan D, Lathia C, Lenz HJ. Safety and pharmacokinetics of the dual action Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor, BAY 43-9006, in patients with advanced, refractory solid tumors. *Clin Cancer Res* 2005;11:5472-5480.
146. Wardelmann E, Thomas N, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Speidel N, Buttner R, et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumours caused by multiple KIT mutations. *Lancet Oncol* 2005;6:249-251.
147. Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: Mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB J* 1994;8:182-191.
148. Fuchs SY. The role of ubiquitin-proteasome pathway in oncogenic signaling. *Cancer Biol Ther* 2002;1:337-341.
149. Zavrski I, Jakob C, Schmid P, Krebbel H, Kaiser M, Fleissner C, et al. Proteasome: An emerging target for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2005;16:475-481.
150. Guedat P, Colland F. Patented small molecule inhibitors in the ubiquitin proteasome system. *BMC Biochem* 2007;8 Suppl 1:S14.
151. Swinney DC, Xu YZ, Scarafia LE, Lee I, Mak AY, Gan QF, et al. A small molecule ubiquitination inhibitor blocks NF-kappa B-dependent cytokine expression in cells and rats. *J Biol Chem* 2002;277:23573-23581. Epub 22002 Apr 23511.
152. Yang Y, Ludwig RL, Jensen JP, Pierre SA, Medaglia MV, Davydov IV, et al. Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer Cell* 2005;7:547-559.
153. Yoshibayashi H, Okabe H, Satoh S, Hida K, Kawashima K, Hamasu S, et al. Siah1 causes growth arrest and apoptosis in hepatoma cells through beta-catenin degradation-dependent and -independent mechanisms. *Oncol Rep* 2007;17:549-556.
154. Frew IJ, Dickins RA, Cuddihy AR, Del Rosario M, Reinhard C, O'Connell MJ, et al. Normal p53 function in primary cells deficient for Siah genes. *Mol Cell Biol* 2002;22:8155-8164.
155. Bursen A, Moritz S, Gaussmann A, Moritz S, Dingermann T, Marschalek R. Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: Indication for t(4;11) pathobiology? *Oncogene* 2004;23:6237-6249.

-
156. Sen N, Hara MR, Kornberg MD, Cascio MB, Bae BI, Shahani N, et al. Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 2008;10:866-873.
 157. Nadeau RJ, Toher JL, Yang X, Kovalenko D, Friesel R. Regulation of Sprouty2 stability by mammalian Seven-in-Absentia homolog 2. *J Cell Biochem* 2007;100:151-160.
 158. Rott R, Szargel R, Haskin J, Shani V, Shainskaya A, Manov I, et al. Monoubiquitylation of alpha-synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells. *J Biol Chem* 2008;283:3316-3328.
 159. Gumbiner BM, McCrea PD. Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *J Cell Sci Suppl* 1993;17:155-158.
 160. Nagafuchi A, Takeichi M. Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: A 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul* 1989;1:37-44.
 161. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509-1512.
 162. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-426.
 163. Ougolkov AV, Yamashita K, Mai M, Minamoto T. Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer. *Gastroenterology* 2002;122:60-71.
 164. Roose J, Clevers H. TCF transcription factors: Molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1999;1424:M23-37.
 165. Chen Y, Chen CF, Riley DJ, Allred DC, Chen PL, Von Hoff D, et al. Aberrant subcellular localization of BRCA1 in breast cancer. *Science* 1995;270:789-791.
 166. Wang H, Shao N, Ding QM, Cui J, Reddy ES, Rao VN. BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases. *Oncogene* 1997;15:143-157.
 167. Monteiro AN. BRCA1: Exploring the links to transcription. *Trends Biochem Sci* 2000;25:469-474.
 168. Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID. BRCA1 gene in breast cancer. *J Cell Physiol* 2003;196:19-41.
 169. Rodriguez JA, Henderson BR. Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1. *J Biol Chem* 2000;275:38589-38596.
 170. Henderson BR. Regulation of BRCA1, BRCA2 and BARD1 intracellular trafficking. *Bioessays* 2005;27:884-893.
 171. Hsu LC, White RL. BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:12983-12988.
 172. Coene ED, Hollinshead MS, Waeytens AA, Schelfhout VR, Eechaute WP, Shaw MK, et al. Phosphorylated BRCA1 is predominantly located in the nucleus and mitochondria. *Mol Biol Cell* 2005;16:997-1010.

-
173. Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, et al. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol* 2005;7:665-674.
 174. Reed JC, Ely KR. Degrading liaisons: Siah structure revealed. *Nat Struct Biol* 2002;9:8-10.
 175. Tokai N, Fujimoto-Nishiyama A, Toyoshima Y, Yonemura S, Tsukita S, Inoue J, et al. Kid, a novel kinesin-like DNA binding protein, is localized to chromosomes and the mitotic spindle. *EMBO J* 1996;15:457-467.
 176. Bruzzoni-Giovanelli H, Faille A, Linares-Cruz G, Nemani M, Le Deist F, Germani A, et al. Siah-1 inhibits cell growth by altering the mitotic process. *Oncogene* 1999;18:7101-7109.
 177. Sankaran S, Starita LM, Groen AC, Ko MJ, Parvin JD. Centrosomal microtubule nucleation activity is inhibited by BRCA1-dependent ubiquitination. *Mol Cell Biol* 2005;25:8656-8668.
 178. Hammond JW, Cai D, Verhey KJ. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:71-76.
 179. Relaix F, Wei X, Li W, Pan J, Lin Y, Bowtell DD, et al. Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2105-2110.
 180. Xu Z, Sproul A, Wang W, Kukekov N, Greene LA. Siah1 interacts with the scaffold protein POSH to promote JNK activation and apoptosis. *J Biol Chem* 2006;281:303-312.
 181. Habelhah H, Frew IJ, Laine A, Janes PW, Relaix F, Sassoon D, et al. Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *EMBO J* 2002;21:5756-5765.
 182. Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoomik A, et al. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 2004;117:941-952.
 183. Qi J, Nakayama K, Gaitonde S, Goydos JS, Krajewski S, Eroshkin A, et al. The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16713-16718.
 184. Shaw AT, Meissner A, Dowdle JA, Crowley D, Magendantz M, Ouyang C, et al. Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis. *Genes Dev* 2007;21:694-707.
 185. Nagai S, Dubrana K, Tsai-Pflugfelder M, Davidson MB, Roberts TM, Brown GW, et al. Functional targeting of DNA damage to a nuclear pore-associated SUMO-dependent ubiquitin ligase. *Science* 2008;322:597-602.
 186. Belzile JP, Duisit G, Rougeau N, Mercier J, Finzi A, Cohen EA. HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog* 2007;3(7):e85.
 187. Le Rouzic E, Belaidouni N, Estrabaud E, Morel M, Rain JC, Transy C, et al. HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DDB1

- ubiquitin ligase. *Cell Cycle* 2007;6:182-188.
188. Zhang Y, Feng S, Chen F, Chen H, Wang J, McCall C, et al. Arabidopsis DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR1 forms a nuclear E3 ubiquitin ligase with DDB1 and CUL4 that is involved in multiple plant developmental processes. *Plant Cell* 2008;20:1437-1455.
189. Kim J, Kipreos ET. Control of the Cdc6 replication licensing factor in metazoa: The role of nuclear export and the CUL4 ubiquitin ligase. *Cell Cycle* 2008;7:146-150.
190. Sedlak TW, Snyder SH. Messenger molecules and cell death: Therapeutic implications. *Jama* 2006;295:81-89.
191. Hugle B, Kleinschmidt JA, Franke WW. The 22 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. II. Immunological characterization and localization of their proteins in tissues and cultured cells. *Eur J Cell Biol* 1983;32:157-163.
192. Lafarga M, Berciano MT, Pena E, Mayo I, Castano JG, Bohmann D, et al. Clastosome: A subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol Biol Cell* 2002;13:2771-2782.
193. Rivett AJ, Palmer A, Knecht E. Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J Histochem Cytochem* 1992;40:1165-1172.
194. Nederlof PM, Wang HR, Baumeister W. Nuclear localization signals of human and thermoplasma proteasomal alpha subunits are functional in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:12060-12064.
195. Schwartz AL, Ciechanover A, Brandt RA, Geuze HJ. Immunoelectron microscopic localization of ubiquitin in hepatoma cells. *EMBO J* 1988;7:2961-2966.
196. Fabunmi RP, Wigley WC, Thomas PJ, DeMartino GN. Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *J Cell Sci* 2001;114:29-36.
197. Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 1994;269:7709-7718.
198. Schmidt M, Haas W, Crosas B, Santamaria PG, Gygi SP, Walz T, et al. The HEAT repeat protein Blm10 regulates the yeast proteasome by capping the core particle. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:294-303.
199. Everett RD, Meredith M, Orr A, Cross A, Kathoria M, Parkinson J. A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J* 1997;16:1519-1530.
200. von Mikecz A. The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci* 2006;119:1977-1984.
201. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ, Jr. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005;44:7342-7372.
202. House CM, Frew IJ, Huang HL, Wiche G, Traficante N, Nice E, et al. A binding motif

- for Siah ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3101-3106.
203. Boehm J, He Y, Greiner A, Staudt L, Wirth T. Regulation of BOB.1/OBF.1 stability by SIAH. *EMBO J* 2001;20:4153-4162.
204. Tiedt R, Bartholdy BA, Matthias G, Newell JW, Matthias P. The RING finger protein Siah-1 regulates the level of the transcriptional coactivator OBF-1. *EMBO J* 2001;20:4143-4152.
205. Subramaniam M, Harris SA, Oursler MJ, Rasmussen K, Riggs BL, Spelsberg TC. Identification of a novel TGF-beta-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4907-4912.
206. Jin W, Di G, Li J, Chen Y, Li W, Wu J, et al. TIEG1 induces apoptosis through mitochondrial apoptotic pathway and promotes apoptosis induced by homoharringtonine and velcade. *FEBS Lett* 2007;581:3826-3832.
207. Venables JP, Dalglish C, Paronetto MP, Skitt L, Thornton JK, Saunders PT, et al. SIAH1 targets the alternative splicing factor T-STAR for degradation by the proteasome. *Hum Mol Genet* 2004;13:1525-1534.
208. Di Fruscio M, Chen T, Richard S. Characterization of Sam68-like mammalian proteins SLM-1 and SLM-2: SLM-1 is a Src substrate during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2710-2715.
209. Wai LK. Telomeres, telomerase, and tumorigenesis--a review. *MedGenMed* 2004;6:19.
210. Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: A novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995;80:279-284.
211. Doong H, Vrillas A, Kohn EC. What's in the 'BAG'?--a functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett* 2002;188:25-32.
212. Tang AH, Neufeld TP, Kwan E, Rubin GM. PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell* 1997;90:459-467.
213. Germani A, Romero F, Houliard M, Camonis J, Gisselbrecht S, Fischer S, et al. hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways. *Mol Cell Biol* 1999;19:3798-3807.
214. Relaix F, Wei XJ, Wu X, Sassoon DA. Peg3/Pw1 is an imprinted gene involved in the TNF-NFkappaB signal transduction pathway. *Nat Genet* 1998;18:287-291.
215. Page-McCaw PS, Amonlirdviman K, Sharp PA. PUF60: A novel U2AF65-related splicing activity. *RNA* 1999;5:1548-1560.
216. Liu J, He L, Collins I, Ge H, Libutti D, Li J, et al. The FBP interacting repressor targets TFIIH to inhibit activated transcription. *Mol Cell* 2000;5:331-341.
217. Hastings ML, Allemand E, Duelli DM, Myers MP, Krainer AR. Control of pre-mRNA splicing by the general splicing factors PUF60 and U2AF65. *PLoS ONE* 2007;2:e538.
218. Matsushita K, Tomonaga T, Shimada H, Shioya A, Higashi M, Matsubara H, et al. An essential role of alternative splicing of c-myc suppressor FUSE-binding protein-

- interacting repressor in carcinogenesis. *Cancer Res* 2006;66:1409-1417.
219. Kroll TT, Zhao WM, Jiang C, Huber PW. A homolog of FBP2/KSRP binds to localized mRNAs in *Xenopus* oocytes. *Development* 2002;129:5609-5619.
220. Rydzziel S, Delany AM, Canalis E. AU-rich elements in the collagenase 3 mRNA mediate stabilization of the transcript by cortisol in osteoblasts. *J Biol Chem* 2004;279:5397-5404.
221. Davis-Smyth T, Duncan RC, Zheng T, Michelotti G, Levens D. The far upstream element-binding proteins comprise an ancient family of single-strand DNA-binding transactivators. *J Biol Chem* 1996;271:31679-31687.
222. Chung HJ, Liu J, Dundr M, Nie Z, Sanford S, Levens D. FBPs are calibrated molecular tools to adjust gene expression. *Mol Cell Biol* 2006;26:6584-6597.
223. Weber A, Liu J, Collins I, Levens D. TFIIH operates through an expanded proximal promoter to fine-tune c-myc expression. *Mol Cell Biol* 2005;25:147-161.
224. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, et al. Proteasome inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999;59:2615-2622.
225. Richardson PG, Anderson KC. Bortezomib: A novel therapy approved for multiple myeloma. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003;1:596-600.
226. Popat R, Joel S, Oakervee H, Cavenagh J. Bortezomib for multiple myeloma. *Expert Opin Pharmacother* 2006;7:1337-1346.
227. Aghajanian C, Soignet S, Dizon DS, Pien CS, Adams J, Elliott PJ, et al. A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. *Clin Cancer Res* 2002;8:2505-2511.
228. Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002;20:4420-4427.
229. Papandreou CN, Daliani DD, Nix D, Yang H, Madden T, Wang X, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2108-2121.
230. Papandreou CN, Logothetis CJ. Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64:5036-5043.
231. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 2007;110:3281-3290.
232. Stapnes C, Doskeland AP, Hatfield K, Ersvaer E, Ryningen A, Lorens JB, et al. The proteasome inhibitors bortezomib and PR-171 have antiproliferative and proapoptotic effects on primary human acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol* 2007;136:814-828.
233. Fenteany G, Schreiber SL. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem* 1998;273:8545-8548.

- 234. Yang Y, Kitagaki J, Dai RM, Tsai YC, Lorick KL, Ludwig RL, et al. Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res* 2007;67:9472-9481.
- 235. Garber K. Missing the target: Ubiquitin ligase drugs stall. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:166-167.
- 236. Lai Z, Yang T, Kim YB, Sielecki TM, Diamond MA, Strack P, et al. Differentiation of Hdm2-mediated p53 ubiquitination and Hdm2 autoubiquitination activity by small molecular weight inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14734-14739.
- 237. Issaeva N, Bozko P, Enge M, Protopopova M, Verhoef LG, Masucci M, et al. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med* 2004;10:1321-1328.
- 238. Espinoza-Fonseca LM. Targeting MDM2 by the small molecule RITA: Towards the development of new multi-target drugs against cancer. *Theor Biol Med Model* 2005;2:38.

6. Danksagung

Sehr geehrter Herr Professor Schirmacher, Ihnen danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in ihrer Gruppe durchführen zu können. Es war schön, dass Sie sich stets Zeit genommen haben und meine Arbeit durch hilfreiche und kritische Anregungen begleitet und unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernd Bukau danke ich für seine Bereitschaft diese Dissertation vor der Biowissenschaftlichen Fakultät der Universität Heidelberg zu vertreten.

Kai, Dir danke ich für die stetige Diskussionsbereitschaft, die uneingeschränkte Unterstützung, dass du immer Zeit für mich hattest und besonders für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Liebes Laborteam: Mona, Eva, Michaela, Marco, Olaf, Rossella, Elisabeth und auch Tanja, vielen lieben Dank für das schöne, freundliche Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft. Insbesondere aber bei Claudia für ihr stets „offenes Ohr“ und dass ich mich so wohl in Heidelberg fühle! Ohne euch wäre der Laboralltag nur halb so schön und ziemlich einseitig gewesen.

Meinen Eltern möchte ich für ihr Unterstützung, ihr Vertrauen und die aufmunternden Worte danken. Es ist schön, dass ihr immer an mich glaubt und euch für das, was ich mache so sehr interessiert!

Dir, Sebastian, danke ich von ganzem Herzen für Deine Unterstützung und dafür, dass es Dich in meinem Leben gibt! Dass du immer für mich da bist, wenn ich dich brauche, für den Rückhalt und die Energie die du mir gibst, die Ruhe und die Motivation, die ich brauche, um alle Aufgaben zu meistern!

Einen herzlichen Dank auch an alle anderen Menschen, die mir bei der Durchführung der Arbeit direkt oder indirekt geholfen haben, allen vorweg Sally, Roland, Thomas, Stephan und meinem Bruder Steffen, die stets an mich geglaubt, mich immer unterstützt und stetig vorangetrieben haben.